

**Kalorimetrische und analytische  
Untersuchungen zur differenzierenden  
Bewertung des Einflusses von Umwelt-  
chemikalien auf die Energetik des  
Wachstums von Escherichia coli und  
Acinetobacter calcoaceticus**

Vom Fachbereich Chemie  
der Universität Oldenburg  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
angenommene Dissertation

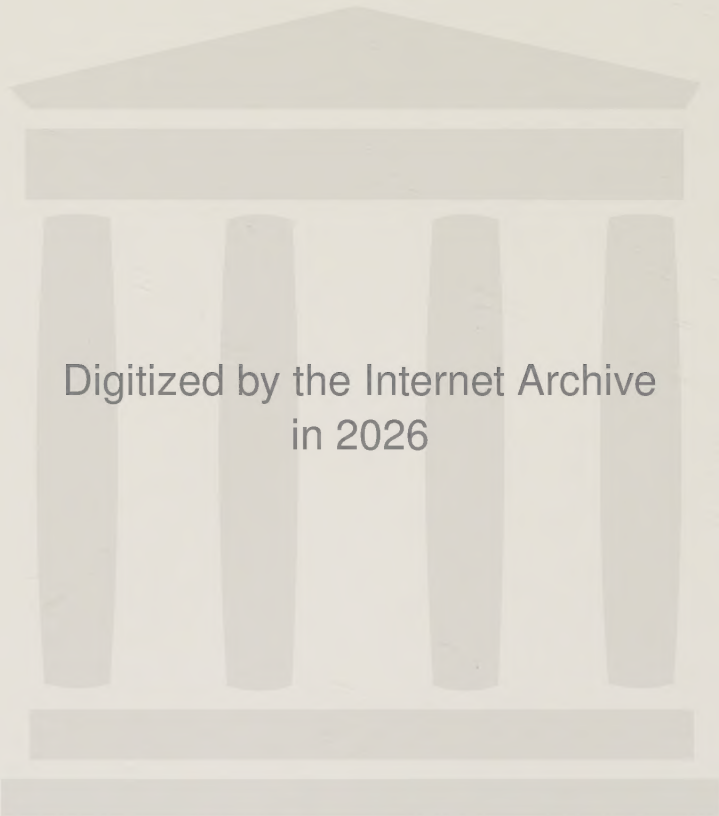
von

Diplom-Biologe  
Peter Weppen  
Geboren am 07.11.1956  
in Osnabrück

*1906*







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41546312\\_0014](https://archive.org/details/IA41546312_0014)

**Kalorimetrische und analytische  
Untersuchungen zur differenzierenden  
Bewertung des Einflusses von Umwelt-  
chemikalien auf die Energetik des  
Wachstums von *Escherichia coli* und  
*Acinetobacter calcoaceticus***

Vom Fachbereich Chemie  
der Universität Oldenburg  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
angenommene Dissertation

von

Diplom-Biologe  
Peter Weppen  
Geboren am 07.11.1956  
in Osnabrück

**Betreuender Gutachter:** Prof. Dr. D. Schuller  
Fachbereich Chemie  
Universität Oldenburg  
Postfach 2503  
D-2900 Oldenburg

**Korreferenten:** Prof. Dr. T. Höpner  
Fachbereich Biologie  
Universität Oldenburg  
Postfach 2503  
D-2900 Oldenburg

Prof. Dr. I. Lamprecht  
Institut für Biophysik WE1  
Fachbereich Biologie (FB 23) der  
Freien Universität Berlin  
Thielallee 63  
D-1000 Berlin 33

**Tag der Disputation:** 29. Oktober 1986

## Meinen Eltern



## Vorwort

Bakterientoxikologie ist sicherlich kein Schwerpunkt der Toxikologie, einer Forschungsrichtung, deren Wurzeln in der Medizin auch heute noch unverkennbar sind. Selbst die recht junge Disziplin der Ökotoxikologie behandelt die Bakterien als Teil unserer belebten Umwelt recht zurückhaltend, wenn es um die Prüfung des Gefahrenpotentials neuer Chemikalien gegenüber der knappen Resource Umwelt geht.

Vor diesem Hintergrund bin ich besonders dankbar, daß ich schon vor mehreren Jahren Gelegenheit hatte, in einem Forschungsprojekt des Bundesministers für Forschung und Technologie an der Entwicklung von **Methoden zur ökotoxikologischen Bewertung von Chemikalien** mitzuarbeiten, das den Bakterien besonderes Interesse widmete. Ein Teil der materiellen Ausstattung der vorliegenden Arbeit entstammt ebenfalls diesem Drittmittelforschungsvorhaben.

Meinen Lehrern, den Herren Prof. Dr. D. Schuller, der diese Arbeit gewissenhaft und mit großem Einsatz betreute, und Prof. Dr. T. Höpner, in dessen Arbeitsgruppe ich stets ein willkommener Gast war und jegliche Unterstützung erhielt, danke ich für ihr ausdauerndes Engagement ganz besonders. Herr Dr. G.-P. Zauke unterstützte mich durch anregende Diskussionen zu Modellbildungsproblemen, wie zu methodisch-wissenschaftlichen Fragen ebenso wie Herr Dr. W. Butte mit seiner Beratung in Fragen der Gaschromatographie oder Rechneranwendungen.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. I. Lamprecht von der Freien Universität Berlin für sein Interesse an meiner wissenschaftlichen Arbeit und die Anregung zur Präsentation von Ergebnissen anläßlich der Ulmer Kalorimetrietage 1985.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für physikalische Chemie, insbesondere Herrn J. Mieglist und Frau S. Panitz danke ich für ihre kollegiale Hilfe und Frau K. Engelke für die Hilfe bei der redaktionellen Aufbereitung des Manuskripts.



# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 0. Kurzfassung / Abstract                                                                                    | 5  |
| 1. Einführung und Problemstellung                                                                            | 7  |
| 1.1. Die verschiedenen Ebenen ökotoxikologischer Analysen                                                    | 9  |
| 1.2. Kalorimetrie als analytisches Hilfsmittel in der physiologischen Forschung                              | 10 |
| 1.3. Konzeption und experimentelles Design                                                                   | 12 |
| 2. Modellorganismen und Referenzchemikalien                                                                  | 14 |
| 2.1. Die Modellorganismen                                                                                    | 14 |
| 2.2. Die Modellchemikalien                                                                                   | 15 |
| 2.2.1. Ökotoxikologisch bedeutsame Eigenschaften der organischen Modellchemikalien                           | 18 |
| 2.2.1.1. Biologischer und nichtbiologischer Abbau                                                            | 18 |
| 2.2.1.2. Toxizitätskennwerte                                                                                 | 20 |
| 2.2.1.3. Lipophilität und Substituenteneinflüsse: Ansätze zur Abschätzung von Struktur-Toxizitätsbeziehungen | 21 |
| 3. Das analytische Instrumentarium                                                                           | 27 |
| 3.1. Bakterienstämme, Kulturmedien und Stammpflege                                                           | 27 |
| 3.2. Kalorimetrische Messungen und Design des Monitorings                                                    | 28 |
| 3.2.1. Prinzipaufbau des kalorimetrischen Monitors                                                           | 29 |
| 3.2.2. Interfacing des Kalorimeters                                                                          | 31 |
| 3.2.3. Chemostat-Kultur im Kalorimeter                                                                       | 32 |
| 3.3. Substrate und Produkte der Chemostat-Kultur von <i>Escherichia coli</i>                                 | 33 |
| 3.3.1. Head-Space GLC-Analytik für Ameisensäure und Essigsäure                                               | 35 |
| 3.3.1.1. Anreicherung und Derivatisierung                                                                    | 37 |
| 3.3.1.2. Gaschromatographische Messung                                                                       | 37 |
| 3.3.2. Glucose Analytik mit dem GOD-Perid-System                                                             | 38 |
| 3.3.2.1. Ausführung                                                                                          | 38 |
| 3.3.3. Ethanol Analytik mit dem Alkohol-Dehydrogenase System                                                 | 39 |
| 3.3.3.1. Reagenzien und Ausführung                                                                           | 39 |
| 3.4. Die Analytik der Testchemikalien                                                                        | 40 |
| 3.4.1. Der Verbleib von niedrigen Teststoffkonzentrationen in biologischen Testsystem                        | 40 |
| 3.4.2. Die Analytik von Quecksilber                                                                          | 41 |
| 3.4.2.1. Quecksilberanalytik Reagenzien und Methode                                                          | 43 |
| 3.4.2.2. Probenvorbehandlung                                                                                 | 43 |

|           |                                                                                                             |           |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.4.2.3.  | Aufschlußverfahren                                                                                          | 43        |
| 3.4.2.4.  | CVAAS Ausführung der Messungen                                                                              | 44        |
| 3.4.2.5.  | Arbeitsbedingungen an der AAS                                                                               | 45        |
| 3.5.      | Die Analytik der Phenole                                                                                    | 46        |
| 3.5.1.    | Spektrophotometrische Bestimmung nach ex-<br>traktiver Aufkonzentrierung und Reinigung                      | 46        |
| 3.5.2.    | Colorimetrische Bestimmung von Phenol                                                                       | 47        |
| 3.6.      | Toxikologische Referenzmethoden                                                                             | 47        |
| 3.6.1.    | Der Wachstumsraten-Hemmtest                                                                                 | 49        |
| 3.6.1.1.  | Ausführung                                                                                                  | 51        |
| 3.6.2.    | Der Atmungsraten-Hemmtest                                                                                   | 51        |
| 3.6.2.1.  | Ausführung                                                                                                  | 51        |
| 3.6.3.    | Kinetischer Atmungsraten-Hemmtest                                                                           | 53        |
| 3.6.3.1.  | Ausführung                                                                                                  | 53        |
| 3.6.4.    | Die Teststoffe                                                                                              | 53        |
| 3.6.5.    | Auswertung toxikologischer Referenztests                                                                    | 54        |
| <b>4.</b> | <b>Qualitätssicherung der analytischen Techniken</b>                                                        | <b>55</b> |
| 4.1.      | Das kalorimetrische System                                                                                  | 55        |
| 4.1.1.    | Einflußgrößen aus dem Luft- und Mediumflow                                                                  | 56        |
| 4.1.2.    | Thermogramm und wahre Wärmestromfunktion                                                                    | 57        |
| 4.2.      | Spezifische Kennwerte des Prototypkalorimeters                                                              | 58        |
| 4.2.1.    | Steady State Wärmeleitkoeffizient des<br>Kalorimeters                                                       | 58        |
| 4.2.2.    | Medium-Flow und Wärmeleitkoeffizient<br>Medium-Flow und Zeitverhalten                                       | 60        |
| 4.2.3.    | Luftdurchsatz und Basislinie                                                                                | 60        |
| 4.2.4.    | Luftdurchsatz und Wärmeleitkoeffizient -<br>Luftdurchsatz und Zeitverhalten                                 | 63        |
| 4.2.5.    | Zeitkonstanten höherer Ordnung                                                                              | 63        |
| 4.2.6.    | Zusammenfassung der kalorimetrischen<br>Kenndaten                                                           | 64        |
| 4.3.      | Die Fettsäureanalytik                                                                                       | 67        |
| 4.3.1.    | Bewertung                                                                                                   | 67        |
| 4.4.      | Die Quecksilberanalytik                                                                                     | 69        |
| 4.4.1.    | Kalibrierversuche und absolute Nachweis-<br>grenzen                                                         | 69        |
| 4.4.2.    | Wiederfindungsdaten der verschiedenen Auf-<br>schlußverfahren mit Referenzstandards                         | 70        |
| 4.4.3.    | Wiederfindung von Quecksilber im biologi-<br>schen Testsystem <i>Escherichia coli</i> und<br>Standardmedium | 71        |
| 4.5.      | Die extraktive spektrophotometrische Analyse<br>der Phenole                                                 | 72        |

|                                                                                                                                                                        |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>5. Experimentelle Befunde an den mikrobiellen Testsystemen</b>                                                                                                      | <b>74</b>  |
| 5.1. Teststoffe und mikrobielles Testsystem                                                                                                                            | 74         |
| 5.1.1. Maximale spezifische Wachstumsrate der Modellorganismen                                                                                                         | 74         |
| 5.1.2. Massenbezogene Kenndaten der Testorganismen                                                                                                                     | 76         |
| 5.1.3. Verteilungskoeffizienten der organischen Modellsubstanzen unter experimentellen Bedingungen                                                                     | 77         |
| 5.1.4. Verbleib der Testchemikalien unter Experimentalbedingungen                                                                                                      | 80         |
| 5.2. Toxikologische Untersuchungen im Batch-Verfahren                                                                                                                  | 82         |
| 5.2.1. Toxizität gegenüber dem mikrobiellen Wachstum                                                                                                                   | 84         |
| 5.2.2. Respirometrische Toxizitätsbestimmung                                                                                                                           | 84         |
| 5.2.3. Zellkonzentrationsabhängigkeit der IC 50                                                                                                                        | 88         |
| 5.2.4. Kinetik der physiologischen Reaktion auf Noxen                                                                                                                  | 90         |
| 5.3. Kalorimetrische Untersuchungsergebnisse                                                                                                                           | 92         |
| 5.3.1. Kalorimetrische Ergebnisse an <i>Acinetobacter</i>                                                                                                              | 97         |
| 5.3.1.1. Graphische Toxizitätsbewertung                                                                                                                                | 98         |
| 5.3.1.2. Biologische Aktivitäten: Energy-Yield                                                                                                                         | 100        |
| 5.3.2. Kalorimetrische Ergebnisse an <i>Escherichia coli</i>                                                                                                           | 103        |
| 5.3.2.1. Graphische Toxizitätsbewertung                                                                                                                                | 103        |
| 5.3.2.2. Biologische Aktivitäten: Dynamik                                                                                                                              | 104        |
| 5.3.2.3. Biologische Aktivitäten: Energy-Yield                                                                                                                         | 106        |
| 5.3.2.4. Biologische Aktivitäten: Enthalpiefluß                                                                                                                        | 108        |
| 5.3.2.5. Long-Term-Toxizitätsscreening an <i>E. coli</i>                                                                                                               | 116        |
| 5.3.3. Zusammenfassung der kalorimetrischen Resultate                                                                                                                  | 124        |
| 5.4. Verbleib der Teststoffe im kalorimetrischen Testsystem                                                                                                            | 125        |
| 5.4.1. Die organischen Teststoffe                                                                                                                                      | 125        |
| 5.4.2. Das Quecksilber                                                                                                                                                 | 128        |
| <b>6. Diskussion der Ergebnisse</b>                                                                                                                                    | <b>131</b> |
| 6.1. Elemente eines Modelles für die Organismen                                                                                                                        | 131        |
| 6.1.1. Wachstumskinetik und -Dynamik als grundlegende Elemente einer Modellvorstellung der toxischen Effekte von Umweltchemikalien gegenüber mikrobiellen Populationen | 131        |
| 6.1.2. Bioenergetik der Bakterienzelle - Energy-Charge und ATP-Pool                                                                                                    | 137        |
| 6.1.3. Acetat als Intermediärstoff von <i>Escherichia coli</i>                                                                                                         | 139        |
| 6.1.4. Zusammenfassung - energiefußorientierte Modellierung des zellulären Stoffwechsels                                                                               | 140        |

|                                                                                           |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.2. Elemente eines Modelles für die Interaktion zwischen<br>Teststoff und Testorganismus | 142 |
| 6.2.1. Physikalisch-chemische Wechselwirkungen                                            | 142 |
| 6.2.2. Expression toxischer Effekte                                                       | 144 |
| 6.3. Modellhypothese zur Interaktion von Noxen mit<br>Mikroorganismen                     | 146 |
| 6.4. Zusammenfassung                                                                      | 148 |
| 6.5. Die innovativen Anteile dieser Arbeit                                                | 150 |

## **Anhang I : Das Programmpaket MEN**

## **Anhang II : Glossar**

## **Literaturverzeichnis**

## **Lebenslauf**

## Kurzfassung

Die direkte Kalorimetrie wurde zur Messung der metabolischen Wärmeproduktion von *Escherichia coli* und *Acinetobacter calcoaceticus* verwendet, die auf einem synthetischen Kulturmedium wuchsen. Analytische Daten zur Kohlenstoffquelle, der Biomasse und metabolischer Produkte wurden herangezogen, um Massen- und Energiebilanzen und Daten zum energetischen Ertragskoeffizienten zu berechnen.

Das Prinzip der Chemostat-Kultur ermöglichte die einfache und reproduzierbare Änderung der Wachstumsbedingungen der Population. Die steady-state Wachstumsrate beeinflusste signifikant die Reaktionen des Wärmestromes und der Energie-Bilanzen, wenn toxische Substanzen zu den Kulturen hinzugefügt wurden. Wir fanden wesentlich ausgeprägtere Steigerungen der Wärmestrom-Daten nach Zugabe von phenolischen Entkoppler-Substanzen bei niedrigen Dilution-Raten, als bei hohen.

Bemerkenswerte Ergebnisse dieser Arbeit waren drei verschiedene Konzepte der differenzierenden Toxizitäts-Bewertung gegenüber Bakterien auf der Grundlage der Wärmeproduktionsrate, des energetischen Ertragskoeffizienten und der energetischen Bilanzierung. Bakterien wurden als eine Gruppe von Zielorganismen für toxische Substanzen in der Umwelt erkannt, die bisher in ihrer Bedeutung unterschätzt wurde.

## Abstract

Direct calorimetry was used to measure the metabolic heat production of *Escherichia coli* and *Acinetobacter calcoaceticus* growing on a synthetic culture medium. Analytical data regarding the carbon source, biomass and metabolic products were used to calculate mass and energy balances as well as energy-yield data.

The principle of the chemostat culture allowed to change the growth conditions of the population easily and well reproducible. The steady state growth rate of the cultures altered significantly the response of heat-flow and energy-balances, if toxic substances were added to the cultures. We found more pronounced increases of the heat-flow after the addition of low concentrations of uncoupling phenols at lower dilution rates than at higher ones.

Remarkable results of this work were three different concepts of toxicity testing on bacteria using the heat production rate, the energy yield or the mass- and energy balances respectively. Bacteria were discussed to be a target of toxic substances in our environment that had been underestimated in its importance up to date.



## 1. Einführung und Problemstellung

Ökotoxikologische Testmethoden haben als Hilfsmittel zur Einschätzung der Wirkung von Chemikalien in unserer Umwelt in den letzten Jahren zunehmende Bedeutung erlangt (Buikema et al, 1982), wenngleich Fragen nach der Übertragbarkeit von ökotoxikologischen Untersuchungen auf die Situation von Ökosystemen kontrovers diskutiert werden und entsprechend zahlreiche Kritiker eine ökotoxikologische Substanzprüfung für fragwürdig halten (Caspers und Hamburger, 1983; Hapke, 1981) oder eine sehr vorsichtige Extrapolation auf die Ökosystemare Ebene ausgehend von isolierten Einzelergebnissen fordern (Cairns Jr., 1983).

Unter zahlreichen Testmethoden, die entweder in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben sind oder gar vereinzelt Eingang in gesetzlich vorgeschriebene Umweltverträglichkeitsprüfungen gefunden haben (Radek und Friedel, 1981), befinden sich einige Testmethoden, die mikrobielle Populationen als Target heranziehen. Hier sind der Wachstumstest für die einzellige Grünalge *Scenedesmus* (OECD-Guidelines, 1981), Wachstumshemmtests an verschiedenen Protozoen (Bringmann, 1978; Bringmann und Kuhn, 1980) und Bakterien (Bringmann und Kühn, 1977) oder Respirationsmeßtechniken zu nennen (Pilz und Axt, 1984). Verschiedentlich werden auch spezifische biochemische Leistungen von Mikroorganismenkulturen herangezogen, wie die Biolumineszenz (Mc Feters et al, 1983), Dehydrogenasenaktivität (Liu, 1981), membrangebundene Transportsystemaktivitäten (Jonas et al, 1984) oder Substratabbauraten (Williamson und Johnson, 1981), ohne eine vollständige Übersicht zu geben.

Ein ökotoxikologischer Ansatz macht die Entwicklung von Kriterien für die Umweltverträglichkeitsbewertung von Chemikalien erforderlich, die über die Toxizitätsbewertung allein und über einfache Mortalitätstests im besonderen, die im wesentlichen aus der medizinischen und pharmakologischen Praxis stammen, weit hinaus gehen (Cairns Jr., 1983), nicht zuletzt, weil die Zielsetzung eine Risikoabschätzung von chemischen Belastungen gegenüber Lebensgemeinschaften in ihrem Lebensraum (eben dem Ökosystem) ist.

Ausgehend von verschiedenen Basisannahmen finden sich in der ökotoxikologischen Literatur zwei grundsätzlich verschiedene Arbeitsrichtungen, die nur selten zu einem gesamtheitlichen Bild zusammentreten. Zum einen die Analyse biozönotischer Effekte von Umweltchemikalien, die auf Beobachtungen von Orga-

nismenarten und -Häufigkeiten mit Art-Abundanz oder Diversitätsindices als Maßwerten beruht (Hart und Cairns, 1984; Gerhart et al., 1977). Dieser methodische Ansatz wird auch häufig auf Untersuchungen an Ein-Art-Systemen reduziert, um detaillierte Erkenntnisse über den Lebenszyklus und die Populationsdynamik einzelner Arten zu gewinnen (Halbach et al., 1983; Kooijman und Metz, 1984). Zwei-Art Modellsysteme, wie etwa bakterienfressende Ciliaten und chemotrophe Mikroorganismen (Tsuchiya et al., 1972; Seto und Tazaki, 1971), dienen der Modellierung von einfachen Rauber-Beute-Systemen. Mikrokosmen haben eine Mittlerrolle zwischen den standardisierten Labortestmethoden und der Ebene der Feldstudien inne (Smies, 1983).

Arbeiten, wie die von Kooijman und Metz (1984) bilden eine Brücke zur energetisch orientierten Arbeitsrichtung, die die zweite Betrachtungsebene darstellt und auf die Bilanzierung von Stoff- und Energieflüssen auf ökosystemebene abzielt. Studien auf dieser Ebene arbeiten mit Primärproduktionsmessungen oder Stoffumsatzmessungen durch primäre und sekundäre Konsumentenetze, wozu auch direkte und indirekte Kalorimetrische Methoden herangezogen werden (Gnaiger, 1979; Gustafsson und Gustafsson, 1983). Die zugrundeliegende Philosophie dieser Anschauungsebene enthält gewissermaßen die Annahme, daß einzelne Teilhaber des Systems durch die Leistungen anderer ersetzt werden können, wie in einem Chemostaten unter verschiedenen Quecksilberbelastungen gezeigt werden konnte (Mayfield et al., 1980). Der energieflußorientierte Ansatz der ökosystemforschung wird auch bei Odum (1983) eingehend gewürdigt.

Die Notwendigkeit der gleichrangigen Beachtung beider Anschauungen unter dem System-Aspekt wird von der OECD Expertengruppe hervorgehoben, wenngleich ganzheitliche Ansätze gegenwärtig noch nicht ausreichend entwickelt sind (OECD, 1981).

Die vorliegende Arbeit soll dazu dienen, eine energieflußorientierte Erfassung biologischer Wirkungen von Chemikalien gegenüber mikrobiellen Lebensgemeinschaften aus einer oder mehreren Spezies mit Hilfe der direkten Kalorimetrie einer eingehenderen Prüfung und Bewertung zu unterziehen. Dies geschieht gleichwohl in dem Bewußtsein, daß nur ein integrativer Aspekt des Verbundsystems einer mikrobiellen Biocoenose bearbeitet wird, wenngleich verschiedene Autoren gerade diesem Aspekt einen hohen Stellenwert einräumen (Cairns, Jr., 1981).

### 1.1. Die verschiedenen Ebenen ökotoxikologischer Analysen

Ökotoxikologische Bewertungen von Chemikalien müssen für die Ebene der Biozönose in ihrer Umwelt valide sein, wie von Hapke treffend formuliert wurde:

*"..., ecotoxicity is the quality of an ecologically foreign substance in relation to its noxious effects on the functions of the biocoenosis."1)*

Diese Auffassung von Ökotoxizität wird mit den Instrumenten der gegenwertigen ökotoxikologischen Praxis, die die Ebene von Individuen (z.B. letale Dosis für Ratten) oder maximal von Populationen (z.B. Lebenszyklus von Daphnien) erreicht, nur ungenugend in die Bewertungsmethoden umgesetzt. Kollektive von Ein-Art-Toxizitätstests müssen für die Risikoabschätzung einer Chemikalie in der Umwelt erhalten, trotz der Unklarheiten hinsichtlich der Übertragbarkeit auf die Freilandsituation (Cairns Jr., 1983). Die Anwendung von wissenschaftlich kaum begründbaren Applikationsfaktoren soll vor Fehlinterpretationen schützen.

Nach Auffassung von Adema und Vink (1981) besitzen Testsubstanzen auf höheren Integrationsbenen innerhalb biologischer Systeme eine ausgeprägtere Schädwirkung, als auf niedrigeren Ebenen. Das Überleben ganzer Organismen stellt in diesem Sinne eine höhere Integrationsebene dar, als beispielsweise die Aufrechterhaltung einer Enzymaktivität, ebenso wie Langzeitbeobachtungen, die den ganzen Lebenszyklus einer Organismenart einbeziehen im Vergleich zu Kurzzeit-Beobachtungen an ausgewachsenen Organismen. Hieraus leiten sich auch die prinzipiellen Unterschiede zwischen Tests auf akute Letalität und Tests auf chronische Wirkungen von Substanzen ab. Eine Bewertungsmethodik für die ökotoxikologische Substanzbewertung sollte aus diesen Gründen auf einer hohen Integrationsebene angesiedelt sein, sofern sie wissenschaftlichen Kriterien standhält (Bui-Kema Jr. et al, 1982).

Halbach et al (1981) vergleichen die Beobachtung populationsdynamischer Auswirkungen einer Schadstoffbelastung anstelle von Individualeffekten bildlich mit der Wirkung eines Vergrößerungsglases. Die Interpretation von qualitativen und

---

1) Hapke, H.-J. (1981): Toxicology and Environmental Chemistry, Vol. 3: pp. 235

quantitativen Beobachtungen auf der Populationsebene stellt weit höhere Anforderungen, als die Bewertung von Endpunkt-Beobachtungen, wie z.B. der Tod eines Versuchstieres. Aufwendige statistische Operationen sind erforderlich, um aus Populationskurven gesichert auf biologische Wirkungen einer Substanz zu schließen. Der Lupeneffekt, der auch kleine zufällige Störungen im Versuchsverlauf betrifft, ist für große Vertrauensbereiche verantwortlich, die den Gewinn an Wirklichkeitsnähe einer Testmethode auf einem hohen Integrationslevel zumindest zum Teil rückgängig machen (z.B. Caspers und Hamburger, 1983).

Arbeiten von Halbach et al (1983) und Kooijman und Metz (1984) belegen, daß sorgfältige Einzelstudien auf der Individualebene, z.B. zum Freßverhalten, zur Futterverwertung, zu Wachstums- und überlebensdaten, eine recht gute Modellierung von Effekten auf der Populationsebene erlauben.

## **1.2. Kalorimetrie als analytisches Hilfsmittel in der physiologischen Forschung**

Moderne biologische Kalorimetrie ist ein expandierendes Arbeitsfeld mit einem zunehmenden Bestand an hochempfindlichen Instrumenten und einer immer breiteren Palette von Anwendungen, wie die Flut von Reviews und Büchern in den letzten Jahren belegt.

Der gegenwärtige Trend steht vor dem erstaunlichen Hintergrund, daß wichtige Anfänge der Kalorimetrie ausgerechnet mit biologischen Objekten und komplexen Problemen, wie dem oxikalischen Quotienten, durch Lavoisier und Laplace im Jahre 1780 begründet wurden, wie Pamatmat (1978) ausführt.

Nach Pamatmat (1978) hat die leichte Verfügbarkeit gasanalytischer Methoden die Kalorimetrie aus biologischen Anwendungen zeitweise verdrängt, da in erster Näherung zwischen  $O_2$  oder  $CO_2$  Umsätzen und kalorischen Daten gute Übereinstimmung besteht. Diese Näherung trifft nicht mehr zu, wenn anoxische Prozesse ablaufen, (Gnaiger, 1979), so daß heute die direkte Kalorimetrie wieder steigende Bedeutung besitzt, wenn Stoffwechselleistungen von Individuen oder Lebensgemeinschaften gemessen werden sollen.

Chowdhry et al (1983) geben einen umfassenden Überblick über kalorimetrische Verfahren zur Analyse von pharmakologischen Wirkstoffen, angefangen von thermochemischen Eigenschaften bis

hin zu biologischen Aktivitäten, wobei die Erfassung quantitativer Dosis-Wirkungsbeziehungen mehrfach demonstriert wird. Die Autoren favorisieren Kalorimetrie vor allem aus Gründen der Zeitersparnis gegenüber konventionellen klinischen Arbeitstechniken oder der Möglichkeit zur Analyse von Rohproben ohne vorherige Aufbereitung.

Wadsö gilt in Fachkreisen sicherlich als einer der aktivsten Wissenschaftler in der Entwicklung von hochsensitiven mikrokalorimetrischen Messsystemen, was durch zahlreiche Arbeiten zur kalorimetrischen Technik belegt wird (Wadsö, 1970, 1980, 1985). Seine Arbeiten spiegeln mindestens zum Teil den Trend der biochemischen Kalorimetrie von Messungen des bakteriellen Stoffwechsels über Säugerzellkulturen zu Konformationsstudien an Biopolymeren mit winzigen Enthalpieänderungen in den letzten Jahren wider. Diese Entwicklung beruht auf der Verfügbarkeit stetig verbesserter Kalorimeter, mit denen immer kleinere Probenmengen und Enthalpieänderungen erfaßbar sind.

Kalorimetrische Untersuchungen mit Bezug zu biologischen Prozessen im Freiland finden sich in zahlreichen Beispielen. Sie rangieren zum Teil am unteren Ende kalorimetrisch erfaßbarer Wärmetönungen, wie Messungen an marinen Invertebraten und Sedimenten (Pamatmat, 1978), an limnischen Organismen (Kaufmann und Gnaiger, 1981), an Benthoslebensgemeinschaften im Jahreszyklus (Lasserre und Tournie, 1984; Tournie und Lasserre, 1984) oder an terrestrischen Reptilien (Lamprecht und Matuschka, 1985), sowie an Belebtschlämmen unter Zusatz von Kohlenstoffquellen und Hemmstoffen (Redl und Tiefenbrunner, 1981a, b; Fortier et al, 1980) belegen.

Kalorimetrische Untersuchungen an mikrobiellen Systemen haben den Bedarf an Möglichkeiten zur exakten Kontrolle der physikalisch-chemischen Parameter offenbart. Ein besonderes Problem ist die Realisierung definiert aerober Meßbedingungen, weil sich die Aufwendung von größeren Fremdenergien in einer Kalorimeterzelle verbietet. Hierzu wurden zwei wesentliche Leitrichtungen entwickelt. Zum einen die Kopplung von Flow-Kalorimetern an handelsübliche Fermenter (Brettel et al, 1981; Cardoso-Duarte et al, 1976). Zum anderen die Verfahren mit In-Situ Betrieb der mikrobiellen Kultur in einer Kalorimetermeßzelle mit kontrollierten Rührmechaniken (Ishikawa et al, 1981), wobei ausreichende Stabilitäten und Meßempfindlichkeiten für recht verdünnte mikrobielle Kulturen erreicht werden. Bench-Scale Kalorimeter, die zur Untersuchung im Technikumsmaßstab herangezogen werden, sind wie Rührkesselreaktoren gebaut und erlauben durch geschickte Konstruktion des Heiz-

Kühlsystems recht empfindliche kalorimetrische Messungen (Marison und von Stockar, 1985). Auch die hochauflösenden Mikrokalorimeter werden mit Ruhrvorrichtungen und Gaseinleitungen von zahlreichen Autoren zur Untersuchung mikrobieller Kulturen benutzt.

Die zuweilen großen Zeitkonstanten kalorimetrischer Messsysteme werden bei der kinetischen Interpretation von Wärmestrom-Zeit-Diagrammen als große Beeinträchtigung angesehen. Verschiedene mathematische Verfahren erlauben aber die Verbesserung der zeitlichen Auflösung selbst bei Kalorimetern mit extrem langen Zeitkonstanten (Marti et al, 1979; Randzio und Suurkuusk, 1980).

### **1.3. Konzeption und experimentelles Design**

Betrachtet man eine Mikroorganismenkultur auf einem Kulturmedium als Population, die sich kontinuierlich fortentwickelt, so können Untersuchungen zur Wachstumsrate, zu Ertragskoeffizienten beziehungsweise Stoffwechseleffizienz oder Substrataffinitäten konzipiert werden, um nur einige mögliche reduktionistische Ansätze zu nennen, die ähnlich wie die Arbeit von Kooijman und Metz (1984) für *Daphnia* gewisse Rückschlüsse auf das In-Situ Verhalten einer mikrobiellen Population zulassen. Die Verifizierung kann durch die integrative kalorimetrische Erfassung der Gemeinschaftsstoffwechselleistung, in der sich zahlreiche Einzeleffekte subsummieren, möglicherweise erbracht werden, ebenso, wie die integrative Beobachtung der Gemeinschaftsleistung möglicherweise Rückschlüsse auf spezifische Effekte einer Noxe erlaubt, wie Halbach et al (1981) an *Brachyonus rubens* mit Mitteln der Populationsökologie zeigen.

Auf der Ebene der Biozönose, also eine Integrationsebene über der Population, müssen in einem ganzheitlichen Ansatz Strukturuntersuchungen zur Diversität der Biozönose in Verbindung mit stofflichen Leistungsbilanzierungen der Gemeinschaft erfolgen, was den Rahmen dieser Arbeit jedoch überschreiten würde. Biozönotische Analysen am protozoenreichen Belebtschlamm eines Schwachlastsystems werden in unserer Arbeitsgruppe von J. Kahle bearbeitet (Schuller und Kahle, 1984).

Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit sind Stoff- und Energieflußbilanzierungen an mikrobiellen Populationen, die an bakteriologischen Reinkulturen erarbeitet wurden, um die Zahl von System-Variablen überschaubar zu halten. Das Konzept einer limitierenden Umweltkapazität (May, 1980) wird durch das

Chemostat-Prinzip (Monod, 1950) simuliert. Vergleichende Untersuchungen zur Wirkung der Modellchemikalien auf einzelne biologische Parameter der Mikroorganismen dienen der differenzierenden Interpretation von Ergebnissen auf der integrativen Ebene der Gemeinschaftsstoffwechselaktivität.

Die instrumentelle Seite dieser Arbeit ist schwerpunktmäßig auf die kalorimetrische Messung der Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen ausgerichtet, wobei eine wesentliche Forderung war, möglichst hochverdünnte mikrobielle Populationen zu bearbeiten, was in einem gewissen Gegensatz zu zahlreichen veröffentlichten kalorimetrischen Arbeitstechniken steht.

Unsere eigene Kalorimeterentwicklung, die bereits detailliert beschrieben wurde (Weppen, 1983), basiert auf der In-Situ Messung einer Bakterienkultur in einem begastem Meßraum, der zugleich kalorimetrische Meßzelle innerhalb einer Zwillingsanordnung ist. Die Empfindlichkeit hochauflösender Mikrokalorimeter wird nicht erreicht, Stoffumsätze von 50 nMol organischem Kohlenstoff pro s sind aber sicher erfaßbar. Verschiedene Arbeitsergebnisse und technische Angaben zu dem Gerät sind bereits veröffentlicht (Schuller und Weppen, 1983; Weppen und Schuller, 1984; Weppen, 1985). In dieser Arbeit wird eine eingehende Prüfung der Wirkung kleiner Störgrößen auf das Kalorimeter präsentiert, der Schwerpunkt liegt jedoch bei der Verwendung des Gerätes zur Erfassung der metabolischen Wärmeproduktion von Chemostatkulturen der Bakterien *Escherichia coli* und *Acinetobacter calcoaceticus* als Bestandteil von Bilanzierungen zur Bestimmung biologischer Wirkungen ausgewählter Modellchemikalien.

Es soll dabei nicht das Anliegen dieser Arbeit sein, eine weitere Standardmethode zur ökotoxikologischen Bewertung von Chemikalien zu etablieren, was aufgrund des großen instrumentellen Aufwandes sicherlich nicht wünschenswert erscheint. Die Arbeit zielt vielmehr auf eine grundlagenorientierte Analyse der speziellen Situation aerober, chemoorganotropher Bakterien als Zielgruppe von Umweltchemikalien ab, die die physiologischen und zellanatomischen Besonderheiten der Gramnegativen Bakterienzelle berücksichtigt. Der Arbeitsschwerpunkt trägt der Bedeutung dieser Bakteriengruppe in aquatischen Lebensräumen Rechnung.

## 2. Modellorganismen und Referenzchemikalien

### 2.1. Die Modellorganismen

Die Auswahl von Modellorganismen für toxikologische Testmethoden stellt sicherlich eine besondere Schwierigkeit dar, wenn man nach reduktionistischer Vorgehensweise (Odum, 1983) zu einem Modell für limnische Ökosysteme kommen will.

Die Problematik der Anwendung von Ein-Art-Toxizitätstests als Vorhersageinstrument für ökologische Risiken von Chemikalien wird in der Literatur umfassend diskutiert. Adema und Vink (1981) kommen nach vergleichenden Untersuchungen zu dem Schluß, daß es **das** Universaltier noch nicht gibt. Cairns (1983) bewertet den Nutzen von Ein-Art-Tests für ökotoxikologische Bewertungen sehr kritisch, sowohl hinsichtlich einer Über- als auch Unterschätzung des Gefahrenpotentials von Substanzen in der Umwelt, bedingt durch das fehlende Wissen über die Wirkungen einer Substanz auf Ökosystemeigene Funktionen. Kenaga (1978) findet statistische Relationen von mehr als drei Zehnerpotenzen für die Toxizität von Modellsubstanzen zwischen verschiedenen Species, um nur wenige Beispiele zu nennen.

Die vorliegende Arbeit folgt einem reduktionistischen Konzept insoweit, als versucht wurde, ein einfaches biologisches Modell für die Biozönose des Belebtschlammes zu finden. Die Ausgangsüberlegung war, daß das technische Verfahren der aeroben Abwasserbehandlung mit lebenden Mikroorganismen ein komprimiertes Abbild der natürlichen mikrobiellen Destruentenflora von Gewässern darstellt; der Belebtschlamm enthält Organismen von der Organisationsebene verschiedener Bakterienstoffwechseltypen über Nahrungsnetze von Protozoen bis hin zu Rotatorien als langlebigste metazoische Vertreter.

Die Isolierung einzelner Bakterienarten aus Belebtschlamm (Weppen, 1983) lieferte die Organismen für die modellhaften Untersuchungen zu Stoff- und Energieflüssen in dem gut kontrollierbaren System der Chemostat-Kultur. Das Bakterium *Acinetobacter calcoaceticus*, eine Gattung, die erst in jüngerer Zeit definiert wurde (Baumann et al, 1968), kann als Vertreter der limnischen Bakterienflora angesehen werden (LaCroix und Cabelli, 1982), es lebt strikt aerob und verwertet nur in Ausnahmen Glucose als Kohlenstoffquelle.

Das wohlbekannte Bakterium *Escherichia coli* findet sich in Belebtschlamm recht zahlreich, zeigt aber in Freilandbiotopen,

wie viele andere Enterobakterien auch, eine negative Wachstumsrate (Savageau, 1983). Die Wahl von *Escherichia coli* als Modellorganismus ist weniger ökologisch begründet als in der Tatsache, daß wohl die meisten molekularbiologischen Erkenntnisse mit dieser Spezies gewonnen wurden (Gottschalk, 1985); insbesondere Untersuchungen an Membranstrukturen, zur pH-Homöostasis oder zellulären Energetik (Nikaido und Vaara, 1985; Booth, 1985).

## 2.2. Die Modellchemikalien

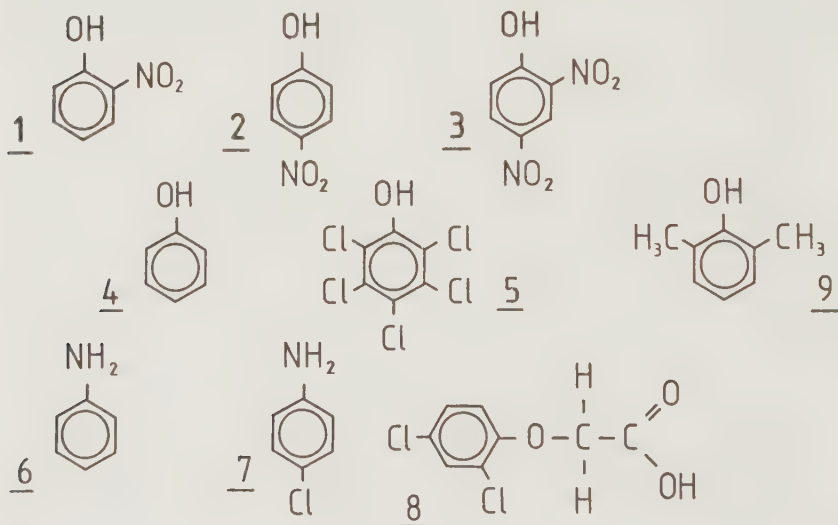
Im Rahmen des Forschungsprogrammes *Methoden zur ökotoxikologischen Bewertung von Chemikalien*, das in der Trägerschaft der Kernforschungsanlage Jülich abgewickelt wurde, diente eine Auswahlliste von Modellsubstanzen der besseren Vergleichbarkeit verschiedener methodischer Ansätze (Scheele et al, 1984). Die Liste umfaßt Substanzen aus verschiedenen Stoffklassen, von den Schwermetallen bis zu polyzyklischen Aromaten. Die organischen Komponenten decken einen weiten Bereich von Polaritäten, Molekulargewichten und Substituenten ab. Vergleichbare Listen von Umweltchemikalien werden auch von Umweltbehörden anderer Staaten herausgegeben (Sittig, 1980), und enthalten eine größere Zahl von Phenolderivaten.

Verschiedene Autoren folgen bei der Auswahl von Modellchemikalien engen systematischen Kriterien. Um Erkenntnisse über Substituenteneinflüsse oder Struktur-Toxizitätsrelationen zu gewinnen, verwenden Liu et al (1982) verschiedene Chlorphenole. Adema und Vink (1981) verwenden Substanzen aus verschiedensten Stoffklassen, um Anhaltspunkte über die Anwendungsbreite einer Testmethode zu gewinnen. In dieser Arbeit haben die Teststoffe reinen Modellcharakter, es sollen weder möglichst zahlreiche Stoffklassen untersucht, noch eng korrelierte Substanzen systematisch getestet werden. Wenige Substanzen aus der BMFT-Liste (Scheele et al, 1984) dienen der exemplarischen Erarbeitung von detaillierten, energieflußorientierten Daten an den ausgewählten Bakterienstämmen. Die Auswahl folgte Kriterien der Handhabbarkeit und Verfügbarkeit von Referenzdaten.

Komponenten mit geringer Wasserlöslichkeit werden in aquatischen Testsystemen, und nur diese sollen hier berücksichtigt werden, zuweilen unter Verwendung von Lösungsvermittlern auf ihre biologische Wirkung untersucht. So verwenden Holcombe et al (1983) Dimethylformamid und Isopropanol. Sie weisen auf das Risiko einer Veränderung der Wechselwirkung zwischen Noxe und

Testorganismus durch den Lösungsvermittler hin, insbesondere bei Überschreitung der natürlichen Löslichkeit der Testkomponente. Die Verwendung von Dimethylsulfoxid als Lösungsvermittler für Chlorbenzole bei Liu und Thomson (1983) wird keiner näheren kritischen Bewertung unterzogen, da DMSO in dem dort verwendeten mikrobiellen Testverfahren keine Wirkung zeigt. Hochgradig flüchtige Komponenten, wie Trichlorethan, können nur in geschlossenen Apparaturen ohne starke zeitliche Konzentrationsänderungen untersucht werden (Galassi und Vighi, 1981; Rogerson et al, 1983).

Es wird deutlich, daß spezifische Eigenschaften der Testsubstanzen spezielle Probleme bei der Ausführung von Toxizitätstests mit sich bringen, was uns veranlaßte, Komponenten auszuwählen, die mindestens mäßig wasserlöslich sind und auch über längere Zeit keine übermäßigen Veränderungen erfahren. Abbildung 2.1. gibt einen Überblick über die Strukturformeln der ausgewählten organischen Komponenten und Tabelle 2.1. vermittelt Daten über Reinheitsgrade und Bezugsquellen.



**Abbildung 2.1.:**

**Die Testchemikalien 2-Nitrophenol (1); 4-Nitrophenol (2); 2,4-Dinitrophenol (3); Phenol (4); Pentachlorophenol (5); Anilin (6); 4-Chloranilin (7); 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (8) und 2,6-Dimethylphenol (9).**

Pentachlorphenol [PCP] und das Quecksilber-II-chlorid wurden besonders eingehend bearbeitet, da fast alle Teilnehmer des o.g. Forschungsprojektes mindestens diese beiden Komponenten in ihren Studien verwenden. Zum PCP liegen darüberhinaus im Umfeld der Arbeitsgruppe einschlägige wissenschaftliche Arbeiten vor (Butte und Blum, 1984; Butte et al, 1985) und Daten zum Verhalten von PCP in der Umwelt finden sich in größerer Zahl.

| SUBSTANZ                                       | SUMMEN-FORMEL   | MOLMASSE | HERSTELLER                  | REINHEIT   |
|------------------------------------------------|-----------------|----------|-----------------------------|------------|
| 2-Nitrophenol                                  | $C_6H_5NO_3$    | 139.11   | Riedel de Haen<br>(Oekanal) | min. 99.9% |
| 4-Nitrophenol                                  | $C_6H_5NO_3$    | 139.11   | Riedel de Haen<br>(Oekanal) | min. 99.9% |
| 2,4-Dinitrophenol                              | $C_6H_4N_2O_5$  | 184.11   | Serva-Feinbio-<br>chemica   | z. A.      |
| Phenol                                         | $C_6H_6O$       | 94.11    | Merck<br>Art. Nr. 206       | z. A.      |
| Pentachlorphenol<br>( PCP )                    | $C_6HCl_5O$     | 266.34   | Ega-Chemie                  | min. 99%   |
| 2,6-Dimethyl-<br>phenol                        | $C_8H_{10}O$    | 122.16   | Merck<br>Art. Nr. 3768      | z. A.      |
| Anilin                                         | $C_6H_7N$       | 93.13    | Merck<br>Art. Nr.           | z. A.      |
| 4-Chloranilin                                  | $C_6H_6ClN$     | 125.57   | Riedel de Haen<br>(Oekanal) | min. 99.9% |
| 2,4-Dichlorphenoxy-<br>essigsäure<br>( 2,4-D ) | $C_8H_6Cl_2O_3$ | 221.04   | Riedel de Haen<br>(Oekanal) | min. 99.9% |
| Dimethylsulfoxid                               | $C_2H_6OS$      | 78.13    | Merck<br>Art. Nr. 2931      | z. A.      |
| Quecksilber-II-<br>chlorid                     | $HgCl_2$        | 271.5    | Riedel de Haen<br>(Oekanal) | min. 99.9% |

**Tabelle 2.1.:**  
Die Modellchemikalien und ihre Herkunft, Reinheitsgrade,  
Summenformeln und Molmassen.

Quecksilber ist neben Cadmium sicherlich das am umfassendsten bearbeitete hochtoxische Schwermetall, es zeigt hohe Anreicherungsfaktoren in den Biota (Itano et al, 1984), findet sich in Klärschlamm ebenso wie in Sedimenten und unterliegt einem intensiven biogeochemischen Stoffkreislauf (Olson, 1984; Prosi, 1983).

Weitere Komponenten, die in dieser Arbeit Verwendung finden, sind Phenol, verschiedene Nitrophenole, ein Alkylphenol, Anilin, 4-Chloranilin und die Dichlorphenoxyessigsäure. Alle Komponenten enthalten einen aromatischen Kern und haben basische oder saure Eigenschaften. Bezugsdaten aus toxikologischen Studien mit verschiedensten Organismenarten und Testsystemen sind verfügbar.

### **2.2.1. ökotoxikologisch bedeutsame Eigenschaften der organischen Modellchemikalien**

Der Stellenwert einzelner physikalisch-chemischer Eigenschaften einer Substanz als Kriterium hinsichtlich einer Bewertung ihrer Umweltrisiken wird sehr kontrovers diskutiert, wie Haltrich (1981) zeigt. Diese Meinungsverschiedenheiten basieren zum Teil schon auf Fragen nach der Methodik, wie derartige Daten zu ermitteln sind (Schuller, pers. Mitt.). Allgemein akzeptiert wird die Bedeutung der biologischen und nichtbiologischen Abbaubarkeit, der Lipophilität und einiger weiterer physikalisch chemische Eigenschaften.

#### **2.2.1.1. Biologischer und nichtbiologischer Abbau**

Die Abbaubarkeit der Testchemikalien dieser Arbeit ist nach Literaturlage gewährleistet, wenngleich z.B. PCP eine recht hohe Beständigkeit aufweist.

$^{14}\text{C}$  markiertes Pentachlorphenol wird nach Arbeiten von Chu und Kirsch (1972) von einer axenischen, PCP metabolisierenden Bakterienkultur nahezu vollständig mineralisiert. Dieser Abbau gilt mindestens unter Laborbedingungen als gesichert (Kirsch und Etzel, 1973). Suzuki (1977) fand an einem PCP abbauenden Bodenbakterium eine rasche Freisetzung von  $\text{CO}_2$  aus dem PCP und den Einbau von PCP-Kohlenstoff in Aminosäuren. Moos et al (1983) untersuchten den Metabolismus von PCP in einer adaptierten kontinuierlichen Mischkultur und fanden für PCP als Kohlenstoffquelle eine konzentrationsabhängige Abbaugeschwindigkeit, die bei schwach toxischer Konzentration ein Maximum

aufweist. Ein ähnlicher Befund liegt für den Abbau von Phenol vor (Beltrame et al, 1979). Hensel und Straube (1983) beschreiben die Wachstumskinetik eines phenolabbauenden Actinomyeten, der seine maximale Wachstumsrate bei 500 bis 800 mg Phenol pro Liter erreicht und aus einem offenen Gewässer isoliert wurde. Eine *Fraternia* Species kann Anilin als einzige Kohlenstoffquelle nutzen (Aoki et al, 1984).

Verschiedene Autoren demonstrieren die erfolgreiche Adaptierung von Belebtschlammssystemen an PCP (Hickman und Novak, 1984), wobei auch recht hohe Konzentrationen zwischen 25 und 150 mg PCP/l bewältigt werden (Edgehill und Finn, 1983).

Im sogenannten Standversuch, einem Standard Test auf die biologische Abbaubarkeit von Substanzen, wird der vollständige Abbau aller Komponenten aus Abbildung 2.1. gefunden, wenn- gleich die Geschwindigkeiten sehr verschieden sind (Pitter, 1976). PCP wurde in dieser Untersuchung nicht berücksichtigt.

Die biologische Abbaubarkeit der Modellchemikalien kann sich im Freiland deutlich von den Laborergebnissen unterscheiden. So finden Butte et al, (1985) auch zwei Jahre nach Beendigung einer PCP-Einleitung in den Jadebusen noch erhöhte Konzentrationen von PCP und dem Metaboliten Tetrachlorphenol in anaeroben Sedimentschichten. Kuiper und Hanstveit, (1984a) finden in marinen Freilandexpositionen eine hochgradige Persistenz von 3,4-Dichlorphenol und führen diese auf den möglichen Mangel an Nährstoffen zurück. Einen sehr langsamen Abbau finden die Autoren für 2-Chlorphenol und 2,4-Dichlorphenol (Kuiper und Hanstveit, 1984b), beide Verbindungen sind in den Standversuchen von Pitter vollständig abbaubar.

Der Abbau von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure [2,4-D] verläuft dagegen in verschiedenen Böden nach einer Arbeit von Ou (1984) recht schnell bis zur Freisetzung von CO<sub>2</sub>.

Der nicht biotische Abbau von organischen Stoffen durch Photooxidation wird für PCP von den Autoren Munakata und Kuwaihara (1969) und Wong und Crosby (1981) in wässriger Lösung näher untersucht. Wong und Crosby finden einen wesentlich langsameren Abbau von PCP bei einem sauren pH-Wert als bei neutralem pH. Die Zersetzung verläuft über violette und braune Zwischenprodukte. Als erstes Zwischenprodukt erscheint ein Tetrachlordiol, eine Mineralisierung über verschiedene Zwischenstufen wird angenommen. Munakata und Kuwaihara geben die Bildung von dimeren Produkten an, denen sie eine hohe Fungizidität zuschreiben.

Die zahlreichen Hinweise zum biologischen Abbau der Modellkomponenten müssen zumindest in Langzeit-Studien berücksichtigt werden, weil sowohl eine Konzentrationsverminderung, als auch eine Aufgiftung durch metabolische Produkte auftreten kann. Die Fähigkeit zum biologischen Abbau scheint nicht ubiquitär, sondern abhängig von der Komponente nur in Spezialisten verfügbar zu sein. Ein Selektionsprozess innerhalb der mikrobiellen Population ist erforderlich, um die Abbauprodukte zu exprimieren (Knackmus, 1983).

#### 2.2.1.2. Toxizitätskennwerte

Wie in der Einführung bereits andiskutiert wurde, ist Toxizität nicht eine Eigenschaft einer Substanz allein, sondern ein irgendwie beobachtbares Resultat komplexer Wechselwirkungen einer Substanz mit einem lebenden Target unter bestimmten physikalisch-chemischen Randbedingungen.

Nach Smeets (1978) lassen sich drei wichtige Teilkomponenten abgrenzen, die methodisch getrennt betrachtet werden können.

- Die **Exposition** des biologischen Targets kann im aquatischen Bereich zumeist als Konzentration ausgedrückt werden. Eine **Exposition** bildet die Grundlage für Wechselwirkungen einer Substanz mit den Organismen.
- Aus der **Exposition** ergibt sich eine **Dosis**, die vom Organismus inkorporiert wird. Die **Dosis** kann durch Analyse der Organismen bestimmt werden.
- **Exposition** und **Dosis** führen zu einem **Effekt** im Target, der mehr oder weniger beobachtbar ist und zur Toxizitätsbewertung herangezogen wird.

Zumeist werden Toxizitätsbewertungen durchgeführt, indem Expositionen und Effekte als abhängige Variablen betrachtet werden und in mathematische Formulierungen gefaßt werden, die eine Angabe von Kenngrößen mit Vertrauensbereichen erlauben (Smeets, 1978; Buikema Jr. et al, 1982; Chan et al, 1984). Die bedeutsame Relation zwischen Exposition und Dosis findet vereinzelt Beachtung und wird mit Verteilungsgleichgewichten (Cairns Jr, 1981); Biokonzentrationsfaktoren (McLeese et al, 1981) und Kennwerten zur Aufnahmekinetik (Bütte und Blum, 1984) beschrieben.

Um einen Eindruck zur Bandbreite von Toxizitätsdaten der Modellchemikalien zu vermitteln, gibt Tabelle 2.2. einige Werte aus der Literatur. Unverkennbar ist die große Variationsbreite der Daten zwischen den Spezies und zwischen den ökotoxikologischen Testmethoden auf verschiedenen Integrationsebenen.

#### **2.2.1.3. Lipophilität und Substituenteneinflüsse:**

##### **Ansätze zur Abschätzung von Struktur-Toxizitätsbeziehungen**

Im Rahmen der ökotoxikologischen Forschung liegt es nahe, nicht nur Beobachtungen zur Wirkung von Stoffen zu sammeln, sondern darüber hinaus sind Modellvorstellungen zu entwickeln, die eine Abschätzung der biologischen Wirkung anhand der Molekülstruktur, z.B. eines Substituenteneinflusses, oder anhand einfach zu messender Eigenschaften, z.B. des Verteilungskoeffizienten zwischen wässriger Phase und n-Octanol, erlauben.

Enge Korrelationen zwischen dem n-Octanol-Wasser Verteilungskoeffizienten oder hierzu gleichwertigen flüssigchromatographischen Retentionsdaten werden für verschiedene Organismen benannt. Liu et al, (1982) geben für die Toxizität von Chlorphenolen gegenüber *Bacillus* sp., der in einem synthetischem Medium mit recht hoher Pufferkapazität auf die Dehydrogenasenaktivität getestet wird, eine Beziehung zum Octanol-Wasser Verteilungskoeffizienten ( $K_{ow}$ ) nach Gleichung 2.1. mit mäßiger Korrelation an.

$$\log \left[ \frac{1}{IC_{50}} \right] = 0.84 \log K_{ow} - 2.54 \quad (Gl.2.1.)$$

Die Autoren bemerken einen toxizitätsmindernden Einfluß einer Chlorsubstituierung an den 2- und 6-Positionen des Phenols und demgegenüber eine schwachere Erhöhung durch Substituierung in der 3- und 5-Position, was dazu führt, daß PCP eine geringere Toxizität zeigt, als beispielsweise 2,3,4,5-Tetrachlorphenol. Für 3,5-Dichlorphenol zu 2,6-Dichlorphenol liegt ein Verhältnis von 1:22 und für 3,4,5-Trichlorphenol zu 2,4,6-Trichlorphenol sogar von 1:44 der toxischen Konzentrationen vor. Die Erweiterung von Gleichung 2.1. um einen Substituenten-Term bringt eine Verbesserung der Korrelation. Einen ähnlichen Substituenteneinfluß beschreiben McLeese et al (1981) für

TABELLE 2.2.A.: Toxisch wirksame Konzentrationen von Hg<sup>II</sup> in verschiedenen Testsystemen

| Species                                                          | Testkriterien                                                              | Konzentration           | Autoren                              |
|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| <i>Leuciscus idus</i><br>(Goldorfe)                              | Standard-Test zur Letalität gegen-<br>über Fischen (48 h)                  | 360 µg / l              | Juhnke & Lüdemann,<br>(1978)         |
| <i>Lepomis macrochirus</i><br>(Bluegill)                         | Letalitäts-Test, statisch über<br>72 h Expositionsdauer                    | 160 µg / l<br>(130-180) | Holcombe, Phipps &<br>Fiandt, (1983) |
| <i>Apfexa hypnorum</i><br>(Schnecke)                             | Letalitäts-Test, statisch über<br>72 h Expositionsdauer                    | 370 µg / l<br>(330-420) | "                                    |
| <i>Daphnia magna</i><br>(Wasserfloh)                             | Verminderung der Schwimmfähigkeit<br>für 50% der Stichprobe                | 15 µg / l               | Bringmann & Kühn (1982)              |
| <i>Spirillum volutans</i>                                        | Beweglichkeit der Trichome                                                 | 200 µg / l              | Dutka & Kwan (1981)                  |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i>                                   | Wachstumsrate (Endpunkt-Test)                                              | 31 µg / l               |                                      |
| <i>Aeromonas hydrophila</i>                                      | Wachstumsrate (Endpunkt-Test)                                              | 49 µg / l               | Bringmann & Kühn (1977)              |
| <i>Pseudomonas putida</i>                                        | Zellvermehrungshemmtest, minimale<br>Hemmkonzentration                     | 70 µg / l               |                                      |
| <i>Scenedesmus quadric.</i>                                      |                                                                            | 50 µg / l               |                                      |
| <i>Chilomonas paramecium</i><br>(Flagellat)                      | Zellvermehrungshemmtest, minimale<br>Hemmkonzentration                     | 11 µg / l               | Bringmann, Kühn &<br>Winter (1980)   |
| <i>Natürliche mikrobielle</i><br><i>Gemeinschaft (Süßwasser)</i> | Anzahl der koloniebildungsfähigen<br>Einheiten (CFU)                       | 10 - 50 µg / l          | Jonas et al (1984)                   |
| <i>Aufwuchsmikroflora</i><br>(phototrophe)                       | Inkorporation von Thymidin oder<br>Glutamat                                | 1 µg / l                | Reinhardt & Bachhaus<br>(1984)       |
|                                                                  | Verminderung der Diversität oder<br>signifikante Art-Abundanz Verschiebung | 10 µg / l               |                                      |

Die referierten Toxizitätsdaten beruhen vollständig auf Nominalkonzentrationen. Der Goldorfontest ist Bestandteil von Standard-Testkonfigurationen ebenso wie der Zellvermehrungshemmtest mit der Grünalge *Scenedesmus quadricauda*.

TABELLE 2.2.B.: Toxisch wirksame Konzentrationen von Pentachlorphenol in verschiedenen Testsystemen

| Species                                        | Testkriterien                                                          | Konzentration<br>µMol/l | Autoren                              |
|------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| <i>Pimephales promelas</i><br>(Fathead minnow) | Letale Konzentration LC 50 im<br>statischen Standardtest               | 0.933                   | Hall & Kier (1984)                   |
| marine Species:                                |                                                                        |                         |                                      |
| <i>Artemia salina</i>                          | Letale Konzentration LC 50 im<br>statischen Standardtest               | 3.7 bis 37              | Adema & Vink (1981)                  |
| <i>Crangon crangon</i>                         | (in Seewasser)                                                         | 3.7 bis 37              |                                      |
| <i>Palaeomonetes varians</i>                   |                                                                        | 0.037 bis 0.37          |                                      |
| <i>Dreissena polymorpha</i>                    |                                                                        |                         |                                      |
| <i>Daphnia magna</i><br>(Wasserfloh)           | Schwimmfähigkeitsbeeinträchtigung<br>in standardisiertem Test (IC 50)  | 3.00<br>(2.48 - 3.60)   | Bringmann & Kühn<br>(1982)           |
| verschiedene Heften:                           |                                                                        |                         |                                      |
| <i>Pichia</i> sp.                              | Wachstumsrate in der Batch-Kultur<br>Hemmung um 50 % (IC 50)           | 39.4                    | Kwasniewska & Kaiser<br>(1983)       |
| <i>Saccharomyces</i> sp.                       |                                                                        | 56.3                    |                                      |
| <i>Rhodotorula rubra</i>                       |                                                                        | 8.3                     |                                      |
| <i>Rhodotorula</i> sp.                         |                                                                        | 22.5                    |                                      |
| <i>Torulopsis</i> sp.                          |                                                                        | 31.9                    |                                      |
| <i>Bacillus</i> sp.                            | Dehydrogenasen-Aktivität<br>Hemmung um 50 % (IC 50)                    | 33.8                    | Liu, Thomson &<br>Kaiser (1982)      |
| <i>Escherichia coli</i>                        | Kalorimetrisch-respirometrisches<br>Kurzzeitmeßverfahren (IC 50)       | 488                     | Reis, Hartmann &<br>Künzmaier (1984) |
| <i>Pseudomonas putida</i>                      | populationsdynamische Größen: Pregnanz<br>Carrying capacity, frequency | 25.9                    |                                      |
| <i>Brachygonus rubens</i>                      | Letale Konzentration                                                   | 0.19<br>0.56<br>0.6     | Halbach et al (1983)                 |
| Aufwuchsmikroflora                             | Biochemische Parameter (ATP, Protein ...)<br>Diversität / Abundanz     | 1.8<br>3.7              | Reinhardt & Backhaus<br>(1984)       |

TABELLE 2.2.C.: Toxisch wirksame Konzentrationen der übrigen Komponenten dieser Arbeit.  
 2-Nitrophenol

| Species                                     | Testkriterien                                                  | Konzentration<br>µMol/l | Autoren                            |
|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| <i>Chilomonas paramecium</i><br>(Flagellat) | Zellvermehrungshemmtest<br>toxisch wirksame Grenzkonzentration | 180                     | Bringmann, Kühn<br>& Winter (1980) |
| <i>Scenedesmus quadricauda</i>              | Zellvermehrungshemmtest                                        | 31                      | Bringmann & Kühn<br>(1977)         |
| <i>Pseudomonas putida</i>                   | toxisch wirksame Grenzkonzentration                            | 6.5                     |                                    |

#### 4-Nitrophenol

|                                               |                                                          |     |                            |
|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----|----------------------------|
| <i>Pimephales promelas</i><br>(Fathead minow) | letale Konzentration LC 50<br>im Standard-Test, statisch | 436 | Hall & Kier (1984)         |
| <i>Scenedesmus quadricauda</i>                | Zellvermehrungshemmtest                                  | 53  | Bringmann & Kühn<br>(1977) |
| <i>Pseudomonas putida</i>                     | toxisch wirksame Grenzkonzentration                      | 29  |                            |

#### 2,4-Dinitrophenol

|                                               |                                                                |                 |                            |
|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------|----------------------------|
| <i>Pimephales promelas</i><br>(Fathead minow) | letale Konzentration LC 50<br>im Standard-Test, statisch       | 91              | Hall & Kier (1984)         |
| <i>Daphnia magna</i><br>(Wasserfloh)          | Schwimmfähigkeitsverminderung<br>auf 50 % (IC 50)              | 33<br>(32 - 34) | Bringmann & Kühn<br>(1982) |
| <i>Pseudomonas putida</i>                     | Zellvermehrungshemmtest<br>toxisch wirksame Grenzkonzentration | 625             | Bringmann & Kühn<br>(1977) |

TABELLE 2.2.D.: Toxisch wirksame Konzentrationen der übrigen Komponenten dieser Arbeit

Phenol

| Species                        | Testkriterien                                      | Konzentration<br>µMol/l | Autor                           |
|--------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| <i>Pimephales promelas</i>     | LC 50 Standard-Test                                | 31                      | Hall & Kier (1984)              |
| <i>Leuciscus idus</i>          | LC 50 Standard-Test                                | 27                      | Juhnke & Lüdemann<br>(1978)     |
| <i>Bacillus</i> sp.            | Dehydrogenasenaktivität<br>Hemmung um 50 % (IC 50) | 24400                   | Lee, Thomson & Kaiser<br>(1982) |
| <i>Pseudomonas putida</i>      | Zellvermehrungshemmtest                            | 680                     | Bringmann & Kühn<br>(1977)      |
| <i>Scenedesmus quadricauda</i> | toxisch wirksame Grenzkonzentration                | 80                      | Halbach et al (1984)            |
| <i>Brachygonus rubens</i>      | Populationsdynamische Effekte                      | 100                     |                                 |
|                                | Letale Konzentration LC 50                         | 6370                    |                                 |
| <i>Aufwuchsmikroflora</i>      | Biochemische Reaktionen (ATP....)                  | 1.1                     | Reinhardt & Backhaus<br>(1984)  |
|                                | Diversität / Abundanz                              | 10                      |                                 |

Anilin

|                                |                                     |       |                                |
|--------------------------------|-------------------------------------|-------|--------------------------------|
| <i>Leuciscus idus</i>          | LC 50 Standard-Test                 | 680   | Juhnke & Lüdemann<br>(1978)    |
| <i>Pseudomonas putida</i>      | Zellvermehrungshemmtest             | 1396  | Bringmann & Kühn<br>(1977)     |
| <i>Scenedesmus quadricauda</i> | toxisch wirksame Grenzkonzentration | 89    |                                |
| <i>Aufwuchsmikroflora</i>      | Biochemische Reaktionen (ATP....)   | 0.011 | Reinhardt & Backhaus<br>(1984) |

4-Cl-Anilin

|                           |                                                   |                       |                                    |
|---------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| <i>Daphnia magna</i>      | Schwimmfähigkeitsverminderung<br>auf 50 % (IC 50) | 25.5<br>(15.1 - 42.2) | Bringmann, Kühn &<br>Winter (1982) |
| <i>Brachygonus rubens</i> | Populationsdynamische Effekte                     | 80                    | Halbach et al (1983)               |

ortho- und parasubstituierte Alkylphenole, wobei jedoch nur zwei Beispiele mit einem vergleichbar geringen Unterschied der Toxizität benannt werden. Zwischen dem Biokonzentrationsfaktor [BCF] und dem Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizienten finden die Autoren eine gut korrelierende lineare Beziehung.

Butte et al (1982) vergleichen theoretisch hergeleitete und flüssigchromatographisch ermittelte, mit Verteilungskoeffizienten eng korrelierte Substanzkenngrößen und finden gute Korrelationen zwischen den experimentellen Daten und Toxizitätsdaten für Fische, Ratten und Wasserflöhe. Für Daphnia wird eine lineare Gleichung, ähnlich Gl.2.1, angegeben, Fischtoxizitäten lassen sich besser nach Gleichung 2.2. korrelieren. Die chromatographischen Kenndaten werden in saurer mobiler Phase für undissoziierte Phenole bestimmt.

$$\log [IC_{50}] = -A * \log [K] + B \quad (Gl.2.2.)$$

Enge Beziehungen zwischen physikalisch chemischen Eigenschaften und toxischen Wirkungen gegen Protozoen bestehen nach Rogerson et al (1983) für Kohlenwasserstoffe. Die Toxizität nimmt mit steigender Lipophilität nach Gl. 2.2. zu. Bei wachsender Wasserlöslichkeit der Komponente vermindert sich die Toxizität. Die Autoren diskutieren eine relativ konstante intrazelluläre Konzentration als toxische Grenze und stärken damit das Konzept einer Beziehung zwischen der Exposition und der Teststoffkonzentration im Organismus. Ausreißer lassen sich mit besonderen stofflichen Eigenschaften erklären.

Quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen können auch mit den Methoden modellhafter Beschreibungen chemischer Bindungen, wie Substituenteneinflüssen, kalkuliert werden, wie Hall und Kier (1984) zeigen.

Die Literaturbeispiele belegen, daß physikalisch-chemische Daten und Modellvorstellungen zu Struktur-Toxizitätsbeziehungen eine wertvolle Hilfe bei der Einschätzung von Risiken durch Umweltchemikalien sind. Unvorhergesehene Effekte können aber leicht übersehen werden, weshalb Toxizitätstests weiterhin einen notwendigen Bestandteil ökotoxikologischer Bewertungen darstellen.

### **3. Das analytische Instrumentarium**

Die experimentelle Erhebung von Zeitreihendaten zur stofflichen Bilanzierung an Chemostatkulturen, zur Kalorimetrie, zur Kontrolle von tatsächlichen Teststoffkonzentrationen und die Erarbeitung notwendiger Hilfsdaten, wie Wachstumshemmtests oder Kurzzeit-Respirations-Tests zur Bestimmung toxisch wirk-samer Teststoffkonzentrationen, erfordert ein methodisches In-strumentarium, das im folgenden Kapitel vorgestellt und im anschließenden Kapitel einer Validitätsprüfung unterzogen wird.

#### **3.1. Bakterienstämme, Kulturmedien und Stammpflege**

Die Ausführungen in Abschnitt 3.4. zeigen, daß ein definiert zusammengesetztes Kulturmedium zur Erzielung reproduzierbarer toxikologischer Testergebnisse zwingend notwendig ist.

Im Rahmen meiner Untersuchungen wurde ein Kulturmedium verwen-det, das aus einem einfachen synthetischen Medium von Proper und Garver (1966) hergeleitet wurde. Gegenüber früheren Zusam-mensetzungen (Weppen, 1983; Weppen und Schuller 1984a) wurden die Konzentrationen der anorganischen Hauptkomponenten wesent-lich verringert (Weppen, 1985). Tabelle 3.1. zeigt die Zusam-mensetzung der verschiedenen Typen dieses synthetischen Nahr-mediums, das im weiteren Text unter der Kurzbezeichnung P&G Medium genannt wird.

Die Untersuchungen zur Energetik des bakteriellen Stoffwech-sels in der Chemostat-Kultur erfolgten mit den Bakterien-stämmen *Escherichia coli* (1a) und *Acinetobacter calcoaceticus* (9), die in einer früheren Arbeit isoliert und charakterisiert wurden (Weppen, 1983), daneben standen noch weitere Mikroor-ganismenstämme zur Verfügung. Die regelmäßige Fortführung der Stammkulturen erfolgte in monatlichen Intervallen auf Schräg-agar und Platten auf dem Hefeextrakt-Pepton-Glucose Agar nach Drews (1976), der mit Natronlauge auf pH 7.3 eingestellt wurde. Die Kulturen wurden nach dem Überimpfen 48 h bei 303 K inkubiert und anschließend bei 283 K im Vorrat gehalten.

Inokulum-Kulturen für Chemostat-Experimente wurden in 100 ml P&G Vorkulturmedium in Erlenmeyerkolben mit Anschlußadaptern für eine Schlauchpumpe über Nacht bei 303 K im Schüttelinku-bator herangezogen.

| Substanz                                        |                          | Konzentration        |                    | Komponente <sup>*)</sup> |
|-------------------------------------------------|--------------------------|----------------------|--------------------|--------------------------|
|                                                 |                          | mMol l <sup>-1</sup> | mg l <sup>-1</sup> |                          |
| Glucose                                         | 1H <sub>2</sub> O §)     | 2.00                 | 396                | I (E. coli)              |
| Na-Acetat                                       | H <sub>2</sub> O frei §) | 6.00                 | 492                | I (Acinetobacter)        |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                | H <sub>2</sub> O frei    | 6.55                 | 930                | II                       |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | H <sub>2</sub> O frei    | 3.42                 | 465                | II                       |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | H <sub>2</sub> O frei    | 3.78                 | 500                | III                      |
| MgSO <sub>4</sub>                               | 7H <sub>2</sub> O        | 0.406                | 100                | III                      |
| CaCl <sub>2</sub>                               | 2H <sub>2</sub> O        | 0.068                | 10                 | IV                       |
| Traces &)                                       |                          | — 1ml/l —            |                    | IV                       |
| FeEDTA #)                                       |                          | — 1ml/l —            |                    | IV                       |

§) Glucose oder Na-Acetat werden alternativ verwendet.

Vorkultur-Medium enthält 5.05 mM Glucose entsprechend 1000 mg/l

§) Na-Acetat oder Glucose werden alternativ verwendet.

Vorkultur-Medium enthält 12.2 mM Na-Acetat entsprechend 1000 mg/l

&) Traces nach Rippka et al (1979): H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, 2.86 g; MnCl<sub>2</sub> 4 H<sub>2</sub>O, 1.81 g; ZnSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O, 0.222 g; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2 H<sub>2</sub>O, 0.390 g; CuSO<sub>4</sub> 5 H<sub>2</sub>O, 0.079 g; Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O, 0.0494 g ad 1000 ml mit Bidest-Wasser lösen.

#) FeEDTA nach Rippka et al (1979): Citronensäure-Monohydrat 6.0 g; Eisen-III-Ammoniumcitrat 6.0 g; Di-Na-Mg-EDTA 1.0 g ad 1000 ml mit Bidest-Wasser lösen.

\*) Komponenten mit gleicher Nummer können zusammen in Teilvolumen durch Autoklavieren sterilisiert werden. Alle vier Komponenten werden nach dem Erkalten unter sterilen Bedingungen vereinigt.

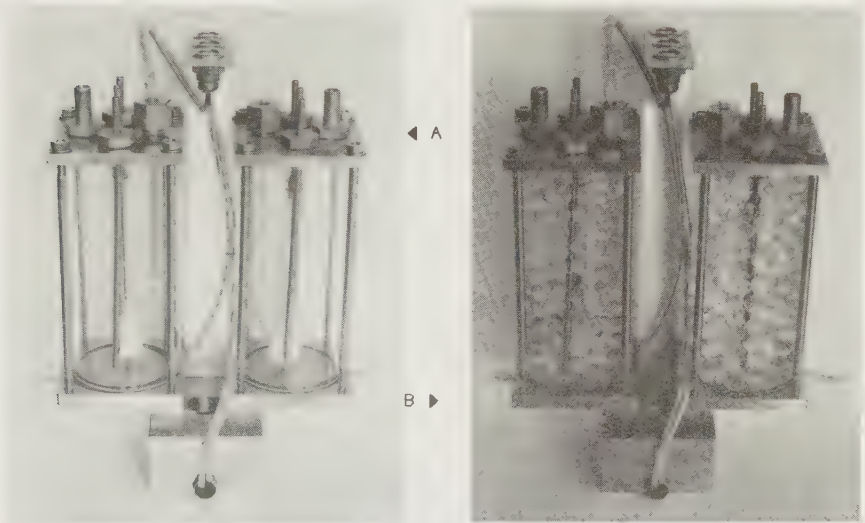
**Tabelle 3.1.: Die synthetischen Kulturmedien für die Batch- und Chemostat-Kultur von *Acinetobacter calcoaceticus* und *Escherichia coli*. Im weiteren Text meist als P&G Medium bezeichnet.**

### 3.2. Kalorimetrische Messungen und Design des Monitorings

Die Eigenentwicklung eines Wärmeleitungs-Zwillings-Kalorimeters bildete das Herzstück des Energiefluß-Monitorings an mikrobiellen Kulturen in dieser Arbeit. Das Gerät wurde bereits beschrieben und erprobt (Weppen, 1983; Schuller und Weppen, 1984, Weppen und Schuller, 1984a; Weppen, 1985), so daß nur ergänzende physikalische Prüfungen in diese Arbeit aufgenommen wurden.

### 3.2.1. Prinzipaufbau des Kalorimetrischen Monitors

Die Abbildung 3.1.A und 3.1.B zeigt die Kalorimetrischen Meßzellen, die als kleine Bioreaktoren ausgelegt wurden, ohne die mikrobiellen Kulturen. Aerobe Bedingungen wurden durch Belüftung mit ölfreier Druckluft über eine präzise Feinregulierung mittels feinporöser Sinterglasfritten erzielt, womit zugleich eine effektive Durchmischung einherging. Die Meßzellen wurden von einer langzeitstabilen Mehrkanal-Schlauchpumpe (Desaga Typ PLG) mit Kulturmedium beziehungsweise deionisiertem Wasser



**Abbildung 3.1.: Die Kalorimeter Meßzellenanordnung.** (A) zeigt die Standardversion, die als Bioreaktor-Meßzellenkombination in den Chemostat-Experimenten eingesetzt wurde. Der Meßraum hat eine Höhe von 100 mm bei einem Lösungsvolumen von 140 ml. Zu erkennen sind die Versorgungsanschlüsse, die Filterkerzen zur Begasung, die elektrischen Kontakte, die Zentralbefestigungsschraube (unten in der Mitte zwischen den Meßzellen der Zwillingenanordnung) und der Temperaturfühler am Sockelteil (NTC-Widerstand). Die linke Reaktorzelle (Meßzelle) enthält einen Pt-100 Widerstand zur elektrischen Kalibrierung, die rechte Reaktorzelle (Referenzzelle) enthält einen *Dummy*. (B) zeigt die gleiche Anordnung für Versuche mit biologischem Rasen auf einem Festbett aus Glaskugeln. Beide Reaktorzellen wurden für diese Versuche mit je 190 g Glaskugeln von 8 mm  $\phi$  gefüllt.

versorgt. Die Flow-Raten wurden mittels Meßburetten genau eingemessen. Eine Probenahme erfolgte über einen Teflon-Schlauch ( $\varnothing$  1.2 mm) direkt aus der Kalorimetermeßzelle, um eine geringe zeitliche Verzögerung zwischen Probenahme und Probenfraktionierung sicherzustellen. Das Zusammenspiel der Systemkomponenten ist in Abbildung 3.2. halbschematisch wiedergegeben.

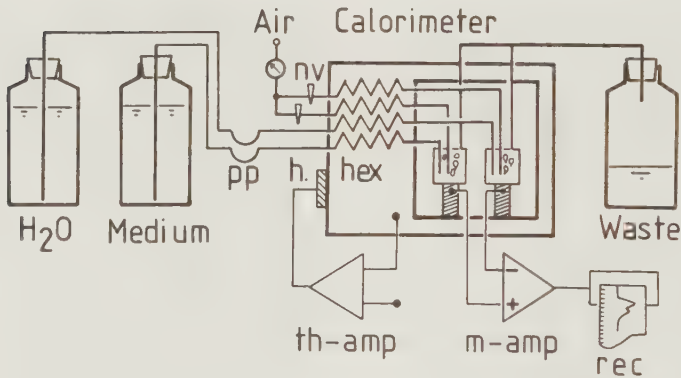
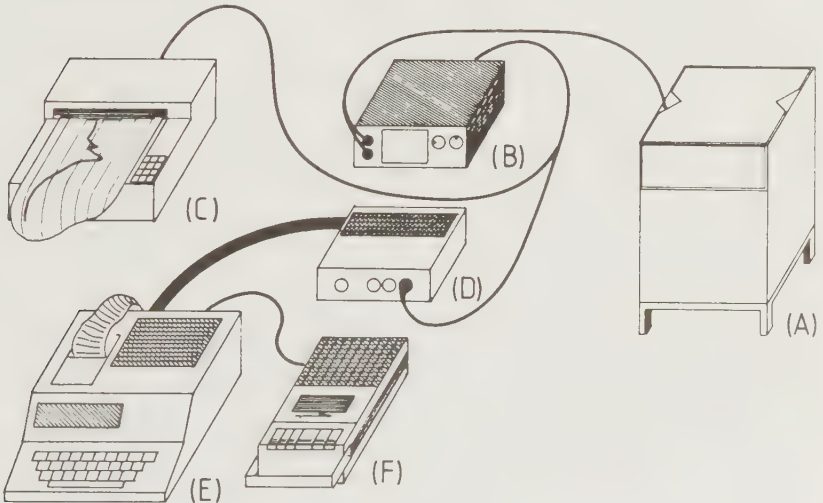


Abbildung 3.2.: Die kalorimetrische Versuchsanordnung. Das Kalorimetersystem befindet sich zentral in einem Wasserbad-thermostaten, der über einen elektronischen Regelkreis (th-amp) und elektrische Heizelemente (h.) konstant temperiert wird. Die kalorimetrische Messung basiert auf der Erfassung der Differenztemperatur zwischen den beiden Meßzellen der Zwillingsanordnung mit dem Meßverstärker (m-amp) und einem Analog-Recorder. Die Flow-Through Versorgung erfolgt aus Vorratsflaschen mit einer Peristaltikpumpe (pp) über Wärmetauscher zur Vermeidung von thermischen Störungen (hex). Die Luftversorgung erfolgt aus dem Labordruckluftsystem über Feindruckregler und Nadelventile (nv). Überlaufende Kultursuspension wird gesammelt (Waste) und sachgerecht entsorgt. (vgl. Weppen und Schuller, 1984a).

### 3.2.2. Interfacing des Kalorimeters

Die Mikrovolt-Meßverstärkereinheit des Kalorimetersystems stellt eine analoge Ausgangssignalspannung proportional zur Differenztemperatur zwischen den beiden Kalorimetermeßzellen zur Verfügung. Dynamische Korrekturen und Umrechnungen in Wärmestrom-Zeit-Funktionen erfolgen unter Verwendung diskreter Meßwerte (Weppen, 1985), die OFF-LINE erst nach Beendigung einer Messung mit einem Personal-Computer ausgewertet werden.

Durch Verwendung eines mikroprozessorgesteuerten Analog-Digitalumsetzers konnte die Datenerhebung auf einen komfortablen OFF-LINE Stand gebracht werden. Hierzu wurde der vierkanalige mikroprozessorsteuerbare A/D-Konverter uPC 7002 nach einem Schaltungsvorschlag von Schon (1983) zusammen mit einem Microcomputer (Siemens, PC 100 mit Prozessor 6502 und 4 kByte RAM



**Abbildung 3.3.: Interfacing des Kalorimetersystems.** Das Kalorimetersystem (A) liefert eine elektrische Spannung, die der Differenztemperatur zwischen den Meßzellen proportional ist. Sie gelangt auf den  $\mu$ -Volt-Verstärker (B), von dort nach geeigneter Zwischenverstärkung zum Analog Recorder (C) und zum A/D-Konverter (D). Der Analog-Digital-Umsetzer mit 12 Bit Genauigkeit wird von einem Microcomputer (E) gesteuert, der eine Timer-Funktion, eine Druckerfunktion und die Mittelwertbildung aus Wiederholungsmessungen erledigt. Die Software für die Digitalvoltmeter-Funktion wird von einem handelsüblichen Cassettenrecorder in den Rechner geladen (F).

und ROM-residentem Minimal-Basic) verwendet. Diese einfache Anordnung lieferte einen Ausdruck von äquidistanten Digitalvoltmeter-Ablesungen. Jeder Meßwert konnte aus einer definierten Zahl von Einzelmessungen gemittelt werden. Der zeitliche Abstand der ausgedruckten Messwerte, die Anzahl und der Abstand der darin gemittelten Einzelablesungen und die Gesamtmeßdauer waren vom Anwender weitgehend frei definierbar. Abbildung 3.3. zeigt den Datenfluß vom Kalorimeter bis zur Registrierung. Die Auswertung der kalorimetrischen Daten zum entgeltigen Meßprotokoll erfolgte mit dem Programmpaket MEN, das in IBM-BASIC geschrieben wurde (siehe Anhang), nach manueller Eingabe der Digitalvoltmeter-Daten.

Eine ON-LINE Datenerfassung und Auswertung, wie sie für zahlreiche Biomonitore gegenwärtig diskutiert wird (Cairns Jr, 1980; Müller, 1982; McMillen und Esch, 1984), konnte aufgrund der begrenzten Kapazität des verfügbaren Microcomputers nicht verwirklicht werden.

### **3.2.3. Chemostat-Kultur im Kalorimeter**

Chemostat-Kulturen von *Acinetobacter calcoaceticus* oder *Escherichia coli* wurden direkt in der kalorimetrischen Meßzelle gehalten, was eine kontinuierliche kalorimetrische Beobachtung erlaubte. Alle Chemostat-Experimente wurden, wie in unseren früheren Arbeiten, bei 303 K durchgeführt. Nach dem Beimpfen mit einer Vorkultur stellte sich reproduzierbar ein steady-state Zustand ein, der durch die Medium-Flow-Rate eindeutig definiert war. Zur Durchführung von Bilanzierungen und Kalkulationen von Yield-Koeffizienten wurden Proben zur analytischen Aufarbeitung entsprechend dem Fließschema von Abbildung 3.4. gewonnen. Das vollständige Probennahmedesign wurde an 40 Testläufen mit *E. coli* angewandt. Messreihen aus den Jahren 1983/84 mußten ohne Analytik der Fettsäuren ausgeführt werden. Untersuchungen an *Acinetobacter* stützten sich nur auf Daten zur Teststoffkonzentration, die Biomassebestimmung und die direkte Kalorimetrie. Ethanol-Analysen in der Chemostat-Kultur von *E. coli* wurden nur stichprobenartig ausgeführt.

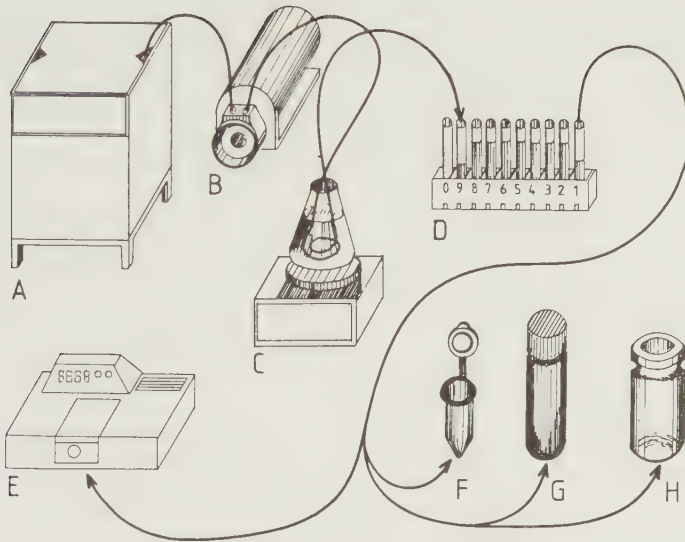


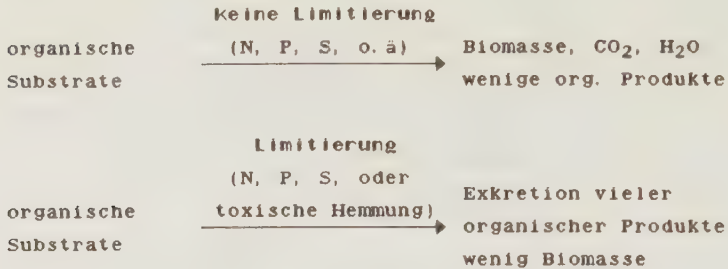
Abbildung 3.4.: Der Weg der Proben für die analytischen Arbeitsschritte zum Monitoring der kalorimetrisch vermessenen Chemostat-Kulturen.

Eine Peristaltikpumpe (B) zieht kontinuierlich einen Probenstrom aus der kalorimetrischen Meßzelle (A). Der Probenstrom liegt bei 70% der Chemostat-Flow-Rate. Das Probengut passiert ein thermostatisiertes Wasserbad zur Inaktivierung der Mikroorganismen (C). Die Temperatur beträgt 368 bis 370 K. Anschließend wird die Probe mittels Fraktionensammler (D) in äquidistante Proben aufgeteilt. Die Proben werden zur Analyse weiterverarbeitet. Zur photometrischen Zelldichtemessung gelangen 2 ml; 1 ml wird in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (F) von Zellen befreit und dient der Glucose- und Ethanolanalytik. 5-20 ml werden in Polypyrol-Zentrifugenbechern zur Analyse auf den Teststoff weiterverarbeitet (G) und 5 ml zusammen mit 500 µl 1 Mol NaOH/l dienen der Fettsäureanalytik (H).

### 3.3. Substrate und Produkte der Chemostat-Kultur von *Escherichia coli*

Das Wachstum von Mikroorganismen auf organischen Substraten führt neben der Bildung von Biomasse zur Erzeugung von Produkten, unter günstigen Bedingungen  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$ , daneben aber auch zu organischen Stoffen, die bei einer Bilanzierung besonders berücksichtigt werden müssen. Vereinfacht kann man sich

eine Regulation der Stoffwechselwege als Reaktion auf die Umweltbedingungen vorstellen.



Flüchtige Fettsäuren, wie Ameisen-, Essig-, Propion- oder Buttersäure spielen als Produkte und Substrate des mikrobiellen Stoffwechsels eine wichtige Rolle (Amin et al, 1983). So dient Essigsäure unter strikt anaeroben Bedingungen als Substrat der Methanbildung. Ameisensäure als das biochemische Analogon des Wasserstoffes erscheint als Fermentationsprodukt von *E.coli* unter anaeroben Reaktionsbedingungen oder wird sogar noch in der Zelle zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> umgesetzt (Gottschalk, 1985).

Neben diesen Stoffen erscheinen zahlreiche weitere Substanzen als intermediäre Produkte unter anaeroben Lebensbedingungen bei fakultativen Anaerobiern wie *E. coli*. Wichtige Stoffe der gemischten Säure-Fermentation von *E.coli* sind neben der C1- und C2- Fettsäure der Wasserstoff, Kohlendioxid, Lactat und Ethanol.

Unter aeroben Bedingungen kann Essigsäure im Stoffwechsel von *E.coli* unter passenden physiologischen Bedingungen energetisch nutzbringend aus dem Schlüsselsubstrat AcetylCoA gebildet werden und auf ähnlichem Wege auch wieder in den Stoffwechsel aufgenommen werden (Ishikawa et al, 1981). Dieser Stoffwechselweg verdient hier unser Interesse, da er eine Möglichkeit bietet, den Energy-Charge der Zelle durch eine substratgebundene ATP-Bildung zu regulieren, während die fermentative Ausschüttung von Intermediaten verschiedenen Zielen dienen muß, wie der Einstellung stabiler Redoxbedingungen innerhalb der Zelle oder günstiger energetischer Bedingungen, d.h. möglichst hoher ATP-Ausbeuten.

Eine Ausschüttung von Ethanol durch *E. coli* erscheint in der Bilanz der gemischten Säure-Fermentation bedeutsam; ob diese Ausschüttung auch aerob erfolgt, wie wir es bei *S. cerevisiae* unter Batch-Gaben von Glucose und als Reaktion einer aeroben Chemostatkultur nach Dosierungen von PCP beobachteten (Kahle et al, 1981), soll stichprobenartig erfaßt werden.

Im Rahmen der Stoff-Fluß-Bilanzierungen an *E. coli* Chemostaten wurde besonderer Wert auf eine zuverlässige Bestimmung der Ameisensäure und Essigsäure gelegt, in einzelnen Testläufen wurde auch Ethanol analysiert. Eine genaue Erfassung des Substratinputs, die mit einer empfindlichen Glucose-Analytik durchgeführt wurde, ist zur Stoffbilanzierung ebenfalls erforderlich. Die angenehme und meist auch leistungsfähige enzymatische Analytik zeigt im Zusammenhang mit toxikologischen Untersuchungen gewisse Schwächen, da Störungen der Analyse durch eine Hemmung der Enzyme durch die anwesenden toxischen Teststoffe zu erwarten sind.

Nichtenzymatische Analysenmethoden für Substanzen wie Glucose, Ameisensäure, Essigsäure oder Ethanol stehen in einem praktischen Halbmikro-Maßstab kaum zur Verfügung, so daß für die Glucose-Analytik auf die enzymatische Methode mit Glucose-Oxidase und Peroxidase und für die Ethanol-Analytik die Alkohol-Dehydrogenase-Methode zurückgegriffen wurde. Eine GC-Direktinjektionstechnik für die Analytik von Ethanol, Propanol und Butanol, die von Goel und Pamment (1984) beschrieben wird, erreicht nicht die erforderliche Nachweisgrenze.

Zur störungsarmen quantitativen Analytik von Ameisensäure und Essigsäure wurde eine leistungsfähige Head-Space-GC-Analysentechnik erarbeitet und an verschiedenen Probenmaterialien erprobt. Die Methode ermöglichte präzise quantitative Analysen in wässrigen Medien bis herab zu Fettsäurekonzentrationen von wenigen  $\mu\text{Mol/l}$  oder Absolutmengen von einigen nMol Fettsäure.

### **3.3.1. Head-Space GLC Analytik für Ameisensäure und Essigsäure**

Die Literatur bietet gegenwärtig verschiedene Methoden zur Bestimmung von flüchtigen Fettsäuren, worunter die C1- bis C6-Carbonsäuren verstanden werden (Volatile Fatty Acids oder VFA). Darunter befinden sich auch spezifische Methoden für einzelne Fettsäuren. So verwenden Sleat und Mah (1984) eine nichtenzymatische photometrische Methode mit einer sicheren Nachweisgrenze bei 0.5 mMol Formiat/l. Höpner und Knappe (1974) benutzen das Enzym Formiat-Dehydrogenase und das Coen-

zym  $\text{NAD}^+$  zur quantitativen Analyse. Eine neuere enzymatische Methode basiert auf dem Enzym Acetat-Kinase und ATP (Bergmeyer, 1977). Ho und Regnitz (1985) schlagen eine elektrochemische Detektion mittels Bioelektrode vor.

Die Analyse von Acetat mit dem enzymatischen System Acetat-Kinase und drei weiteren Enzymen besitzt eine hohe Empfindlichkeit (Bergmeyer, 1977), wobei eine nachgeschaltete Reduktionsreaktion von  $\text{NAD}^+$  zur UV-Photometrischen Bestimmung dient. Ein Nachteil ist die Nichtlinearität bei niedrigen Acetat-Konzentrationen.

Unter den chromatographischen Methoden zur Analytik von flüchtigen Fettsäuren finden sich sehr einfache Direkt-Injektionstechniken (Narkis et al, 1980), die in unserem Labor jedoch nicht erfolgreich angewendet werden konnten und darüber hinaus eine Analytik von Ameisensäure nicht gestatten, da ein mit Ameisensäure gesättigter Trägergasstrom verwendet wird.

Eine extraktive Anreicherung der Fettsäuren vor der gaschromatographischen Trennung mittels Diethylether schlägt Colenut (1979) vor, eine Bestimmung von Ameisensäure ist jedoch nicht möglich. Barcelona et al, (1980) schließlich verwenden eine Ionen-Austausch-Anreicherung mit anschließender aufwendiger Derivatisierungsprozedur zur flüssigchromatographischen und gaschromatographischen Bestimmung.

Larson et al, (1984) ziehen eine Etherextraktion sowie anschließende Rückextraktion in wässrige Phase als Konzentrierungsmethode heran und vermessen die Konzentration der Fettsäuren nach Ansäuern der wässrigen Probe mittels Head-Space-Gaschromatographie auf einer Kapillarsäule (SP-1000). Die Wiederfindung für Essigsäure war 40-60 Prozent, Ameisensäure wurde nicht erfaßt.

Die Methodenentwicklung für die eigenen Arbeiten konnte aus diesen zum Teil apparativ oder manuell sehr aufwendigen Verfahren teilweise profitieren. So wurde die Head-Space-Technik verbunden mit einer Gefriertrocknung zur Probenkonzentrierung und einer Derivatisierung mit Methanol in saurer wässriger Lösung als praktikable und zuverlässige Methode erarbeitet.

### **3.3.1.1. Anreicherung und Derivatisierung**

In Anlehnung an die Methode von Ansbaek und Blackburn (1980) wurden 5 ml Probenvolumen zusammen mit 500 µl 1 Mol NaOH z.A./l in Rollrandgläsern von 10 ml Volumen in einer Tiefkühltruhe bei 255 K eingefroren. Zur Vermeidung der Aufnahme von Fettsäuren aus der Atmosphäre wurden die Proben mit gasdurchlässigen Wattestopfen verschlossen und in einem geschlossenen Gefäß unter Petrischalen mit NaOH-Pellets gelagert. Die gefrorenen Proben wurden in einer Lyophilisationsanlage Typ Christ Alpha mit Varian Vakuumpumpe bis zu einem Enddruck von 0.1 Pascal über den Proben gefriergetrocknet. Hierbei konnten etwa 200 Proben simultan getrocknet werden.

Die Trockenrückstände wurden in 500 µl einer 1:1 Mischung aus 5 Mol Schwefelsäure z.A./l und Methanol z.A. aufgenommen und sofort mit Butylgummistopfen und Aluminium Crimpkappen gasdicht verschlossen. Eine Vorbehandlung der Butylgummistopfen in Methanol für 48 h mit anschließender Wäsche in Bidest-Wasser und Trocknung bei 353 K war zur Erzielung niedriger Blindwerte notwendig. Die verschlossenen Proben reagierten 2 h bei 333 K in einem Luftthermostaten und wurden danach bei 255 K bis zur GC-Messung gelagert.

### **3.3.1.2. Gaschromatographische Messung**

Der Gaschromatograph war ein RoutineGerät Typ Shimadzu GC-Mini 2 mit TP-M2R Temperaturprogrammer und zwei FID-Detektoren in Differenzanordnung und gepackten Glassäulen. Das Detektorsignal wurde über einen 1:100 Zwischenverstärker (Eigenbau, Weppen, 1985) und ein hochauflösendes Digitalvoltmeter (Setaram 0257) zum Rechner (Hewlett-Packard HP 86) übertragen, auf dem ein Programm zur Aufnahme, Integration und Dokumentation von Gaschromatogrammen lief (Mieglitz, 1986, modifiziert).

Als Trennphasen wurden verschiedene kommerzielle Produkte und eigene Präparationen verwendet. Porapak Q 80-100 mesh von Riedel de Haen; 15% Polyethylenglycol 6000 auf Shimalite TPA 30-60 mesh von Shimadzu; 15% PEG 20000 (Merck) auf Chromosorb W-HP 80-100 mesh (Merck) und auf Chromosorb W-AW 80-100 mesh (Merck) als eigene Präparate. Verwendet wurden Säulen von 2m Länge und 2.5mm innerem Durchmesser jeweils paarweise identisch gepackt und mit säuregewaschener Quarzwolle gesichert. Die Injektion erfolgte direkt auf das Säulenende.

Zur Head-Space-Analyse wurden die verschlossenen Proben mindestens 10 Minuten bei 318 K äquilibriert. Mit Hilfe einer in einem Widerstandsofen auf ca. 323 K temperierten gasdichten Präzisionspritze (Hamilton 1000 µl gastight) wurde eine Probe von 1000 µl aus dem Gasraum der Probengläser entnommen und in den GC injiziert. Die Spritze wurde vor der Gasentnahme aus den Probengefäßen mit 1000 µl Raumluft gefüllt, um einen Unterdruck des Gases in den Proben zu vermeiden.

Als Trägergas für die Trennung diente Stickstoff von 99.996% Reinheit mit einer Strömungsrate von 30 ml/min. Die FID's arbeiteten mit 30ml Wasserstoff/min und 500 ml Luft/min. Die Temperaturen der Detektoren und Injektoren wurden bei 453 K gehalten, die Trennsäulen arbeiteten abhängig vom Material isotherm bei 333 bis 353 K (PEG-Materialien) oder mit Temperaturprogramm 4 Minuten isotherm 413 K dann mit 5 oder 10 K/min bis 480 K und nach weiteren 5 Minuten zurück zum Anfangswert (Porapak Q). Der Detektor wurde bei maximaler Empfindlichkeit mit Abschwächungen zwischen 2 und 256 benutzt.

### **3.3.2. Glucose-Analytik mit dem GOD-Perid-System**

Die enzymatische Bestimmung von Glucose beruht auf der Umsetzung von Glucose in Gegenwart von O<sub>2</sub> am Enzym Glucoseoxidase unter Bildung von Gluconsäure und H<sub>2</sub>O. mit einer nachgeschalteten Reaktion an Peroxidase zur Farbstoffbildung. Der Test ist komplett durch die Firma Boehringer Mannheim unter dem Handelsnamen GOD-Perid-Methode zu beziehen.

#### **3.3.2.1. Ausführung**

Proben wurden vor dem Test auf Glucose durch eine Zentrifugation von zellulären Bestandteilen befreit. Zu diesem Zweck dienten 1000 µl Probe in Eppendorf-Reaktionsgefäßen, die auf einer Eppendorf-Zentrifuge 5 Minuten zentrifugiert wurden. Der Überstand dieser Zentrifugation fand auch zur Alkoholbestimmung Verwendung. Zur Verminderung von Störeinflüssen wurden 500 µl des Überstandes dieser Zentrifugation in einem neuen Reaktionsgefäß mit 50 µl 0.5 Mol Schwefelsäure/l und 100 µl Chloroform versetzt, gemischt und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt diente zur Entfernung von Phenolen und sauren Stoffwechselprodukten durch Extraktion. Leerwerte und Standards wurden in gleicher Weise mitbehandelt.

Die Analyse erfolgte in 8x100mm Glasteströhrchen mit 1000  $\mu$ l GOD-Reagenz und 20 bis 200  $\mu$ l Probevolumen. Die Inkubationsdauer betrug 60 Minuten bei 303 K. Eine Überprüfung der Analytik erfolgte durch Kalibrierreihen und Standardadditionen zu einzelnen Proben. Der Meßbereich der Methode umfaßte 0-100  $\mu$ Mol Glucose/l bei 200  $\mu$ l- Probevolumen und Messung bei 436 nm und 0-2000  $\mu$ Mol/l bei 20  $\mu$ l Probevolumen und Messung bei 578 nm Wellenlänge.

### **3.3.3. Ethanol-Analytik mit dem Alkohol-Dehydrogenase-System**

Die Ethanol-Bestimmung mit Alkoholdehydrogenase (ADH) beruht auf der Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd bei gleichzeitiger Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}+\text{H}^+$  in einem gepufferten wässrigen System. Semicarbazid wird zur Entfernung des Acetaldehydes aus dem Reaktionsgleichgewicht zugegeben (Bergmeyer, 1977).

#### **3.3.3.1. Reagenzien und Ausführung**

Natriumpyrophosphat-Puffer bestehend aus 33 g Tetranatriumpyrophosphat, 8,3 g Semicarbazid ethanolfrei, sowie 1,7 g Glycin in einem Liter Bidest-Wasser. Der pH-Wert wurde mit 4 Mol NaOH/l auf pH 8,7 eingestellt. NAD als freie Saure (Grad II 98%ig, Boehringer Mannheim) wurde zu einer Konzentration von 16,7mg/ml in Bidest-Wasser gelöst, ADH lyophilisiert (aus Hefe, Boehringer Mannheim No. 1027981) wurde zu einer Proteinkonzentration von 30 mg/ml in Bidest-Wasser gelöst, entsprechend etwa 50 mg Lyophilisat.

Zur Ausführung der Analysen wurde ein Mix aus 50 ml Puffer, 1 ml NAD-Lösung und 200  $\mu$ l ADH-Lösung für etwa 50 Bestimmungen bereitet. Die Halbmikroanalyse bestand aus 1000  $\mu$ l Mix und 200  $\mu$ l Probe. Die Probelösung mußte klar und frei von UV-absorbierenden Bestandteilen sein, sie durfte den pH-Wert des Ansatzes nicht verändern. Die Analysenansätze wurden zusammen mit gleichbehandelten Blindproben für 45 Minuten bei 303 K inkubiert und anschließend in Halbmikroküvetten bei 334 nm oder 366 nm im Spektralphotometer Kontron Uvikon 860 gemessen. Die Konzentrationsberechnung erfolgte mit den Standard-Extinktionskoeffizienten von  $\text{NADH}+\text{H}^+$ , der bei Netheler (1977) mit  $3,4 \times 10^3 \text{ l/Mol} \cdot \text{cm}$  für 365nm beziehungsweise  $6,18 \times 10^3 \text{ l/Mol} \cdot \text{cm}$  für 334nm angegeben ist.

Die Verdünnungsgrenze lag bei 1 mMol Ethanol/l bei 334 nm beziehungsweise 2 mMol Ethanol/l bei 365 nm bezogen auf die verwendete Volumenaufteilung. Der Test konnte durch Zugabe von Standards auf seine Funktionstüchtigkeit geprüft werden.

### **3.4. Die Analytik der Testchemikalien**

#### **3.4.1. Der Verbleib von niedrigen Teststoffkonzentrationen in biologischen Testsystemen**

Die analytische Kontrolle tatsächlich vorhandener Teststoffkonzentrationen ist insbesondere in komplexeren biologischen Testsystemen zur ökotoxikologischen Bewertung von Chemikalien eine zwingende Notwendigkeit (Holcombe et al, 1983; Buikema et al, 1982). So muß mit Abweichungen zwischen der Nominalkonzentration, das heißt der aus Aufwandmenge und Volumen berechneten Konzentration, und der tatsächlichen Konzentration aus verschiedenen Gründen gerechnet werden. Eine Substanz kann sich verflüchtigen, wenn ein Testsystem gegen die Atmosphäre offen ist (Galassi und Vighi, 1981), sie kann durch Adsorption an oder durch chemische Reaktion mit Bestandteilen der Testapparatur verschwinden oder sie kann durch mikrobiellen Abbau eliminiert oder in Produkte mit anderen, auch toxischen, Eigenschaften umgewandelt werden (Buikema et al, 1982). Zu dieser Form der Umwandlung gehört z.B. die mikrobielle Alkylierung von Metallen, insbesondere Zinn, Blei, Quecksilber, die erheblich abweichende biologische Wirkungen zeigen (Röderer, 1983; Jonas et al, 1984). Schließlich können physikalisch-chemische Prozesse, wie die Photooxidation oder eine langsam fortschreitende Hydrolyse zu einer Veränderung der Konzentrationen führen (Wong und Crosby, 1981).

Unabhängig von diesen Eliminationswegen kann die Verteilung einer Substanz zwischen den Testorganismen eines aquatischen Toxizitätstests und dem Testmedium zu einer Verminderung der gelösten Konzentration im Kompartiment Wasser führen (McLeese et al, 1981).

Darüberhinaus ist die Frage nach der Verfügbarkeit des Teststoffes bedeutsam, da insbesondere bei Metallen eine Gleichgewichtseinstellung zwischen verschiedenen chemischen Spezies eintreten kann, die von zahlreichen physikalisch-chemischen Faktoren des Untersuchungswassers abhängen. So konnte gezeigt werden, daß verschiedene Peptone, die üblicherweise in bakteriologischen Nährböden Verwendung finden, eine erhebliche Verminderung der Verfügbarkeit von freien Metallionen von

Quecksilber hervorrufen (Olson, 1984). Organische Komplexbildner, wie Gluconsäure oder EDTA können ebenfalls zu einer Verringerung des Anteiles freier Ionen führen (Prosi, 1983; Tevlin, 1978). In Seewasser liegt Quecksilber-II zumeist in der Form von Chlorkomplexen mit anionischem Charakter vor ( $\text{HgCl}_4^{++}$ ) (Babich und Stotzky, 1983).

Im Gegensatz zu den Schwermetallen liegen für organische Stoffe weitaus weniger Daten über die Verteilung und die chemische Speziation in Umweltmatrices vor. Im Falle von basischen oder sauren Stoffen, wie den in dieser Arbeit verwendeten Anilin- und Phenolderivaten, findet sich mindestens ein Verteilungsgleichgewicht zwischen der undissoziierten Form und der anionischen beziehungsweise kationischen Form, die sich in ihrer biologischen Wirkung unterscheiden (Fisher und Wadleigh, 1986).

Die aufgeführten Hinweise dürften als Begründung für eingehendere Untersuchungen zum Verbleib der Teststoffe genügen.

### 3.4.2. Die Analytik von Quecksilber

Quecksilber ist in allen erdenklichen Matrices untersucht worden, woraus eine verwirrende Zahl von Aufschluß- und Analysenmethoden für die verschiedensten Materialien resultierte. Besondere Probleme bei der Analytik in Umweltproben bereitet die hohe Flüchtigkeit der Quecksilberverbindungen, die eine Anwendung offener Aufschlußtechniken bei höheren Temperaturen verbietet.

Zahlreiche veröffentlichte Aufschlußmethoden zielen auf die Analyse von organischen Probenmaterialien ab, wobei große Mengen Proteine, Fette, Lipide, Kohlenhydrate und andere Biomoleküle verascht werden müssen. Golimowski und Gustavsson (1983) beschreiben einen Aufschluß mit einer Mischung aus konzentrierter Salpetersäure und Schwefelsäure für Fisch in geschlossenen Bechern. Louie (1983) fügt der Säuremischung noch konzentrierte Salzsäure zu und findet eine verbesserte Wiederfindung, die er der Bildung des stabilen Chlor-Komplexes zuschreibt. Marts und Blaha (1983) benutzen diesen Aufschluß unter Zusatz von Vanadium-Pentoxid als Katalysator an großen Probeneinwaagen, in Gegenwart von hohen Lipid-Gehalten wird eine Behandlung mit Wasserstoffperoxid zwischengeschaltet.

May und Schoeppler (1984) verwenden einen Aufschluß mit Salpetersäure oder einer Mischung aus Salpetersäure und Perchlorsäure für die extreme Spurenanalyse in geschlossenen Quarz-

gefaßen. Verschiedene Verfahren des Aufschlusses mit Salpetersäure und Wasserstoffperoxid finden Verwendung an massiven biologischen Proben. Sansoni und Kracke (1969) arbeiten mit Eisenkatalysator bei 373 K in offenen Gefäßen, Janssen (1982) verwendet eine Druckaufschlußapparatur. Haas und Krivan (1984) beschreiben einen Aufschluß mit Salpetersäure, Salzsäure und Wasserstoffperoxid mit einem aufwendigen vielstufigen Arbeitsablauf ebenfalls für größere Feststoffproben.

Kunkel (1972) verwendet die Wickbold-Verbrennungsapparatur zum Aufschluß verschiedenster Proben, weist aber auf einen relativ hohen Untergrundwert seiner Analytik hin.

Zur Bestimmung von Quecksilber in Seewasser verwenden Yamazaki et al (1978) einen Aufschluß mit verdünnter Schwefelsäure und Salpetersäure, der am Rückfluß gekocht wird. Hg wird aus dieser Lösung mit Zinn-II-chlorid freigesetzt und in einer Vorlage mit Kaliumpermanganat aufgefangen. Aus dieser angereicherten Lösung wird Quecksilber mittels Kaltdampfverfahren nach Vorreduktion des Permanganat-Überschusses mit Hydroxylamin und Reduktion mit Zinn-II-Chlorid analysiert.

Zur quantitativen Messung der Quecksilber-Konzentration in Aufschlußlösungen finden sich verschiedene Verfahren. Die meisten der oben genannten Autoren verwenden die Kaltdampf-Technik, die z.B bei Yamazaki et al, 1978 eingehend beschrieben ist.

Photometrische Verfahren mit organischen Komplexbildnern benötigen etwa die 100-1000 fache Absolutmenge an Quecksilber (Cheng und Goydich, 1966; Nonova und Stoyanov, 1984).

Neutronenaktivierungsanalyse (NAA) findet gelegentlich als anerkannte Referenztechnik Anwendung (Golimowski und Gustavsson, 1983). Die Verwendung der radioaktiven Isotope  $^{203}\text{Hg}$  oder  $^{109}\text{Cd}$  kommt in Modellstudien zur Aufnahme und Freisetzung von Metallen zum Einsatz und erübrigt aufwendige Aufschlußprozeduren (Brunnert und Zadrazil, 1983; Fowler et al, 1975).

Im Rahmen meiner Untersuchungen ist ein Aufschluß erforderlich, der lediglich geringe Absolutmengen an organischer Substanz bewältigen muß, da die verwendeten Testmedien nur etwa 12 mMol Kohlenstoff im Liter enthalten. Die Methode muß ohne extremen apparativen Aufwand große Probenzahlen bewältigen, damit sowohl Proben aus Chemostat-Versuchen, als auch andere Zeitreihenuntersuchungen durchführbar sind.

Als Detektionsverfahren bietet sich die flammenlose Atomabsorptionspektrometrie nach dem Kaltdampfverfahren [CVAAS=Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry] wegen der hohen Nachweisempfindlichkeit und Verfügbarkeit innerhalb des Arbeitskreises an.

#### **3.4.2.1. Quecksilber-Analytik - Reagenzien und Methode**

Die Bestimmung von Quecksilber in wässrigen Medien erfolgte durch direkten Naßaufschluß von Probelösungen und anschließende CVAAS mit Reduktion durch Zinn(II)-chlorid. Alle Reagenzien hatten mindestens die Qualität **zur Analyse**. Vier einfache Aufschlußmethoden wurden vergleichend untersucht, wobei der Kaliumpermanganat-Schwefelsäure-Aufschluß schließlich als Routine verwendet wurde.

#### **3.4.2.2. Probenvorbehandlung**

Proben aus biokalorimetrischen Versuchen und anderen Tests wurden entweder als vollständige Suspension mit Zellen oder als zellfreie Lösung eingesetzt.

Zur Gewinnung der zellfreien Lösung wurden die Bakterien durch Zentrifugation aus der Suspension abgetrennt, wobei 25 ml-Zentrifugenbecher aus Polypropylen bei 283 K und 10000 g für 15 Minuten in der Zentrifuge Kontron H-401 mit Festwinkelrotor A8/24 zur Anwendung kamen. Alternativ wurde eine Membranfiltration im Sartorius-Druckfiltrationsapparat SM 16510 mit Membranfiltern der Porenweite 0,47 µm, Typ HA der Firma Millipore verwendet. Mindestens die ersten 5 ml Filtrat wurden verworfen, um die Membranfilter zu äquilibrieren.

#### **3.4.2.3. Aufschlußverfahren**

- **Aufschluß mit Kaliumpermanganat:** 2000 µl Probelösung wurden in 16x160mm Duran-Schraubdeckelröhrchen mit 500 µl 0,2 Mol Kaliumpermanganat/l und 200 µl Schwefelsäure (9 Mol/l) gemischt. Die Röhrchen wurden mit Schraubdeckeln mit teflonbeschichteten Dichtungen verschlossen und 18h bei 353 K gehalten. Vor der CVAAS wurde der entstandene Braunstein durch Auffüllen mit Natriumnitrit-Lösung (72 mMol/l) zu 10,0 ml Endvolumen vorreduziert.

- **Aufschluß mit Salpetersäure:** 2000 µl Probelösung wurden mit 1000 µl Salpetersäure (14 Mol/l) gemischt. Die Ansätze wurden in offenen Röhrchen vier Stunden bei 353 K im Wasserbad gehalten.
- **Aufschluß mit Schwefelsäure / Salpetersäure:** 2000 µl Probelösung wurden unter Eiskühlung mit 1000 µl Salpetersäure (14 Mol/l) und 1000 µl Schwefelsäure (9 Mol/l) gemischt. Der Aufschluß erfolgte in offenen Röhrchen bei 353 K für 4 h im Wasserbad.
- **Aufschluß mit Salpetersäure / Wasserstoffperoxid:** 2000 µl Probelösung wurden unter Eiskühlung mit 1000 µl Salpetersäure (14 Mol/l) und 500 µl 30%igem Wasserstoffperoxid gemischt. Aufschluß wie bei Salpetersäure.

Die Säureaufschlüsse wurden nach dem Abkühlen mit Bidest-Wasser auf 10.0 ml aufgefüllt.

#### 3.4.2.4. CVAAS: Ausführung der Messung

Die Kaltdampf-Einrichtung, die in Anlehnung an die Beschreibung bei Yamazaki et al (1978) erstellt wurde und am Varian-Techtron AA5 Atomabsorptionsspektrophotometer betrieben wurde, ist in Abbildung 3.5. dargestellt. Um eine Kondensation von Wasserdampf auf den Quarzfenstern der 170 mm Langküvette zu vermeiden, erfolgte eine Beheizung durch eine Drahtwicklung, die die Küvette auf ganzer Länge auf etwa 323 K erwärmte. Der Aufbau ist in Abbildung 3.5. dargestellt.

Die Reduktion der Aufschlußlösung erfolgte in einem Zentrifugenbecher aus Polycarbonat mit 35 ml Volumen. 2000 µl Probelösung und 8000 µl Schwefelsäure (90 mMol/l) wurden nach -Verschließen des Reduktionsgefäßes mit 500 µl 10%iger Zinn-II-Chloridlösung in Salzsäure (400 mMol/l) versetzt. Ein Magnetrührkern sorgte für Kräftige Durchmischung. Nach 60 Sekunden Reaktionszeit wurde das reduzierte Quecksilber mit Stickstoff in die Langküvette ausgeblasen. Nach Abklingen des Absorptionspeaks wurde die Langküvette direkt mit N<sub>2</sub> gespült. Stickstoff strömte mit 1000 ml/min über ein Druckminderventil und Nadelventil zur Feineinstellung.

### 3.4.2.5. Arbeitsbedingungen an der AAS

Die AAS Varian-Techtron AA5 arbeitete im Modus Absorption bei 254 nm Wellenlänge und minimaler Dämpfung. Der Monochromatorspalt wurde auf 150  $\mu\text{m}$  gesetzt. Die Quecksilber-Hohlkathodenlampe arbeitete mit 3 mA Lampenstrom nach etwa 30 Minuten stabil. Die optischen Elemente wurden so justiert, daß der Focus in der Mitte der Langküvette lag und der Strahlquerschnitt nirgends mit der Glaswandung Berührung hatte. Das Ausgangssignal wurde auf einem Hitachi-Kompensationsschreiber mit einer Empfindlichkeit von  $E=0-0,200$  beziehungsweise  $E=0-0,500$  aufgezeichnet.

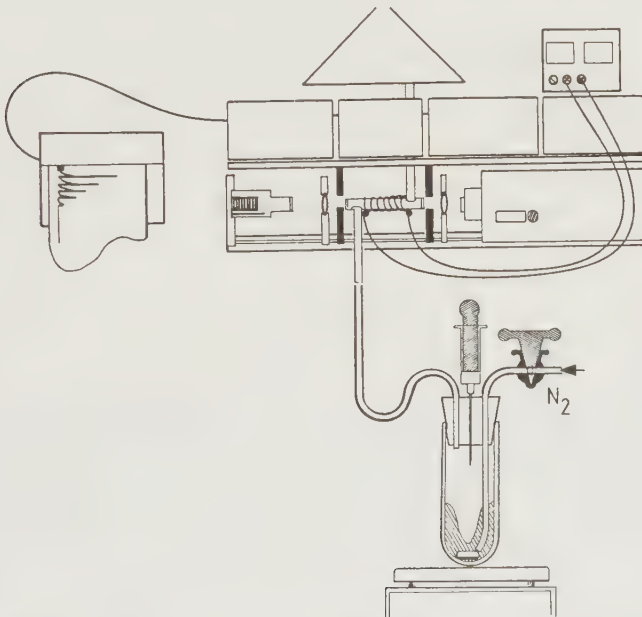


Abbildung 3.5.: Die CYAAS zur Quecksilberanalytik. Die AAS Varian-Techtron AA5 wird zum Zweck der Hg-Analytik geringfügig modifiziert. Eine 170 mm lange Rohrküvette mit Heizwicklung wird mittels selbstgefertigter Adapter auf dem Standardbrenner montiert und kann so mühelos exakt justiert werden. Die beiden Linsen des optischen Systems werden auf Abstände von  $2f$  /  $4f$  /  $2f$  justiert, so daß eine Abbildung der Hohlkathode mittig in der Küvette erfolgt, was jedoch nur in Grenzen präzise möglich ist.

Das eigentliche Reaktionsgefäß (B) besteht aus einem Polycarbonat-Zentrifugenbecher mit Rührkern, einer genau geregelten Stickstoffzufuhr und einem Schaltventil, das ohne *Einschleichen* den Stickstoffstrom freigibt. Die Injektionsspritze dient der Zudosierung von Zinn-II-Chlorid in das geschlossene Reaktionsgefäß.

### **3.5. Die Analytik der Phenole**

Aus den oben aufgeführten Gründen ist auch bei den organischen Teststoffen eine analytische Kontrolle von Ist-Konzentrationen erforderlich. In der Literatur finden sich zahlreiche Methoden zur Bestimmung von Chlorphenolen in biologischen Probenmaterialien, die jedoch meistens einen erheblichen apparativen Aufwand erfordern.

Die Extraktion aus biologischen Proben mit Schwefelsäure und eine mehrstufige Reinigung verwenden Niimi und Cho (1983) zur gaschromatographischen Bestimmung von PCP in Fisch. Renberg (1981) entfernt zur Bestimmung von Chlorphenolen in Wasser zunächst neutrale und basische Stoffe durch Alkalisieren der Wasserprobe und Extraktion mit Hexan. Durch Zusatz von Bicarbonat und Pentachlorbenzoylchlorid werden die Phenole in der verbleibenden wässrigen Phase derivatisiert und zur Gaschromatographie in Hexan extrahiert. Die gaschromatographische Bestimmung erfolgt auf einer Kapillarsäule mit ECD-Detektor.

Eine einfache extraktive Derivatisierungstechnik mit TESH, die ebenfalls auf GC-ECD-Detektion ausgerichtet ist, beschreiben Butte et al (1982).

Eine HPLC-Technik, die zusätzlich die Bestimmung von Nitrophenolen ermöglicht wird bei Buckmann et al (1984) an Standardmischungen von Phenolen demonstriert.

Zum Zweck der Kontrolle von PCP-Konzentrationen in Toxizitätstestsystemen und ähnlichen Laborstudien verwenden Carr et al (1982) eine extraktive Aufkonzentrierung mit spektrophotometrischer Gehaltsbestimmung. Die Nachweisgrenze liegt bei 5 µg PCP/l, wenn 1000 ml Probe eingesetzt werden. Diese Methodik wird auch von Edgehill und Finn (1983) in einem Belebtschlamm-system bei höheren PCP Konzentrationen angewendet.

#### **3.5.1. Spektrophotometrische Bestimmung nach extraktiver Aufkonzentrierung und Reinigung**

Die Bestimmung der Phenole erfolgte nach dem Verfahren von Carr et al (1982) mittels extraktiver Anreicherung und Reinigung und anschließender spektralphotometrischer Gehaltsbestimmung.

Zur Extraktion wurden 50 ml Glasstöpseiflaschen mit 25 ml zellfreier Probe oder einem kleineren, auf 25 ml aufgefüllten Probenvolumen beschickt. Die Proben wurden mit 500 µl Schwefelsäure (9 Mol/l) versetzt und nach Zugabe von 5 ml Chloroform wurden die Phenole in die organische Phase überführt. Zur spektrophotometrischen Messung wurden 3 ml organische Phase mit gleichem Volumen NaOH (0.1 Mol/l) in Zentrifugengläsern rückextrahiert. Die Phasen wurden durch Zentrifugation 5 Min. 5000 UPM sauber voneinander getrennt und die wässrige Phase gegen gleichbehandelte Blindproben im Spektralphotometer Kontron UVikon 860 vermessen. Die Wellenlänge richtete sich nach dem Absorptionsmaximum des Phenolat-Anions.

### 3.5.2. Colorimetrische Bestimmung von Phenol

Die Bestimmung von Phenol erfolgte nach der 4-Nitroanilin-Methode (Merck Firmenschrift ohne Jahresangabe) die auf ein Probenvolumen von 10 ml verkleinert wurde. Die Verdünnungsgrenze lag bei 50 µMol Phenol/l. Angaben zur Anwendung dieser Methodik und ihrer Selektivität finden sich bei Kakac und Vejdelek (1983).

### 3.6. Toxikologische Referenzmethoden

Eine Betrachtung der Toxizitätskennwerte aus verschiedenen Testverfahren in den Tabellen 2.2.A-D. zeigt die große Inter-Spezies Bandbreite toxisch wirksamer nominaler Teststoffkonzentrationen sehr deutlich. Im Falle von Quecksilber-II-Chlorid ist der Standard-Fischtest an der Goldorfe am wenigsten sensibel, während mikrobielle Testsysteme, insbesondere diejenigen, die auf mikrobiellen Artengemeinschaften beruhen, hochsensibel reagieren. Die Konzentrationsspanne bewegt sich zwischen 1 µg/l und 370 µg/l.

Für Pentachlorphenol zeigen die Toxizitätsdaten ein völlig anderes Bild. Der Fischtoxizitätstest und Tests mit *Daphnia magna*, ebenso wie das populationsdynamische Testverfahren an *Brachyonus rubens* oder die Aufwuchsmikroflora, weisen PCP als hochtoxisch aus. Die mikrobiellen Testverfahren überdecken eine große Spanne toxisch wirksamer Konzentrationen, die weit über den toxischen Konzentrationen in den vorgenannten Tests liegen.

Auf die geringe Übertragbarkeit von Toxizitätstestergebnissen zwischen den Arten wird von verschiedenen Autoren hingewiesen (Adema und Vink, 1981; Kenaga, 1978; Dutka und Kwan, 1981).

Bringmann und Kühn (1977) geben für die Verhältnisse der Toxizitätszahlen zwischen *Pseudomonas putida* und *Scenedesmus quadricauda* eine Spanne von mehreren Zehnerpotenzen in beide Richtungen an. Eine von Weppen (1983) ausgeführte statistische Auswertung der Daten von Bringmann (1978), Bringmann und Kühn (1977), Bringmann und Kuhn (1980) und Bringmann et al (1980) ergab, daß die Verhältniszahlen der toxischen Konzentrationen von 130 Chemikalien zwischen den Organismen *Pseudomonas putida* und *Uronema parduzi* (Ciliat) beziehungsweise *Chilomonas paramecium* und *Entosiphon sulcatum* (beide Flagellaten) näherungsweise LOG-Normal-verteilt sind. Im Mittel war *Pseudomonas* knapp zweimal empfindlicher als der Ciliat, und *Entosiphon* etwa zweimal empfindlicher als *Chilomonas*. Die 95% Vertrauensbereiche lagen bei Verhältniszahlen von 59 beziehungsweise 130, was erstaunlich war, da die taxonomische Beziehung zwischen dem Bakterium *Pseudomonas putida* und dem Ciliaten *Uronema* sehr gering ist, während die beiden Flagellaten doch in einer engeren taxonomischen Beziehung stehen.

Die Beispiele mögen ausreichen als Begründung für die Notwendigkeit, Toxizitätskennzahlen für die Modellchemikalien gegenüber den ausgewählten Modellorganismen in einfachen Screening-Methoden selbst zu erheben, um später eine Abschätzung von kalorimetrisch beobachtbaren Effekten am komplizierteren Modell der Chemostatkultur vornehmen zu können.

Screening Tests für diese Arbeit sollen mehrere Randbedingungen erfüllen:

- Der physiologische Zustand der Testorganismen soll reproduzierbar sein.
- Die physikalisch-chemischen Parameter sollen denen in der Chemostat-Kultur weitgehend gleichen.
- Es sollen physiologische Leistungen zur Bewertung toxischer Einflüsse herangezogen werden, die einen bedeutsamen Teilaspekt der biochemischen Gesamtleistung der Organismenpopulation widerspiegeln.
- Die Tests müssen genau definierte Maßzahlen über einen Effekt zur Verfügung stellen.
- Die Tests müssen praktikabel sein und eine Datenbehandlung nach Konzepten der klassischen Toxikologie (vergl. Kap. 2.2.1.2.) erlauben.

Mit diesem Forderungenkatalog weichen die toxikologischen Referenzmethoden dahingehend vom kalorimetrischen Testverfahren ab, daß sie definierte Endpunkte zur Bewertung von Chemikalieneinflüssen liefern, während die Kalorimetrie an der Chemostatkultur ein populationsdynamisches Abbild eines zeitlichen Effekts eines Teststoffes auf den Gemeinschaftsstoffwechsel liefern soll.

### **3.6.1. Der Wachstumsraten-Hemmtest**

Unter den Testmethoden, die in Tabelle 2.2. referiert wurden, werden Messungen des Wachstums von Mikroorganismen verschiedentlich herangezogen. Der Zellvermehrungshemmtest von Bringmann und Kuhn (1977) exponiert die Organismen für eine definierte Zeit in einem Medium, das ein Zellwachstum ermöglicht. Nach dieser Zeitspanne wird die Konzentration der Organismen in unbelasteten und schadstoffbelasteten Testansätzen ausgewertet, eine signifikante Verminderung von etwa 3% gegenüber den Kontrollen wird als toxische Grenzkonzentration angegeben, wobei keine Schätzung der statistischen Fehlerbreite möglich ist. Honig et al (1980) berechnen die Wachstumsrate eines Flagellaten mit Hilfe der Zellzahlmessung am Anfang und Ende einer definierten Inkubationsperiode.

Eine Toxizitätsbewertung auf der Grundlage der Messung des Sauerstoffverbrauches einer wachsenden Mikroorganismenpopulation mit Hilfe der Warburg-Technik wurde von uns vorgeschlagen (Weppen, 1983). Da das Prinzip dieser Methode für das Verständnis der kalorimetrischen Arbeiten von Nutzen ist, soll es hier genauer erläutert werden.

Das Wachstum von Organismen kann im engeren Sinn nur an der Biomasse exakt erfaßt werden. Wenn andere Parameter als Maß für das Wachstum von Biomasse dienen sollen, so muß eine Proportionalität zwischen diesem Parameter und dem Wachstum bestehen. Derartige korrelative Beziehungen sind als Yield-Koeffizienten in verschiedenen Definitionsformen, z.B. bezogen auf Substrate, auf Sauerstoff auf Kohlendioxid oder ATP, bekannt (Herbert, 1976).

Nach Fenchel und Finlay (1983) besteht bei Protozoen eine lineare Beziehung zwischen Biomassewachstum und Sauerstoffaufnahme, während der Sauerstoffverbrauch für die Erhaltung der aktiven Biomasse sehr gering ist. Diese Auffassung besteht auch für Mikroorganismen (Pirt, 1975). Wenn man diese korrelative Beziehung zugrundelegt, dann besteht zwischen dem Sauer-

stoffverbrauch in einer definierten Zeitspanne und dem Biomassezuwachs eine Proportionalität, die man dazu benutzen kann, aus Sauerstoffaufnahmedaten mit den bekannten Verfahren der mikrobiellen Wachstumskinetik auf die spezifische Wachstumsrate zu schließen.

Die Warburgtechnik stellt meßtechnisch den Sauerstoffverbrauch als Integral über die Zeit zur Verfügung, im Gegensatz zu einer Biomassebestimmung ist der Anfangswert aber Null. Rechnerisch muß der Sauerstoffverbrauch zur Synthese der Startmasse ermittelt werden, wenn die Sauerstoffverbrauchsdaten durch logarithmische Transformation und deren erste Ableitung in spezifische Wachstumsraten umgesetzt werden sollen. Gleichung 3.1. soll diesen Zusammenhang verdeutlichen.

$$Oxi(t_0) + \int_{t_0}^t Oxi(t-t_0) = Oxi(t_0) e^{\mu t} \quad (Gl. 3.1)$$

Als Messwerte stehen die Werte des Integrals über die Zeit zur Verfügung, durch Logarithmieren und iterative Anpassung wird der  $Oxi(t_0)$  Wert ermittelt und die Wachstumsrate ( $\mu$ ) berechnet. Das Verfahren ist bedingt durch die Verwendung der Warburg-Technik aufwendig in der Ausführung und liefert ein Ergebnis, das näherungsweise auf das Biomassewachstum übertragbar ist, wenn die stöchiometrische Beziehung zwischen Sauerstoffverbrauch und Biomassezuwachs nicht beeinflußt wird.

Das neue Verfahren beruht auf der Trübungsmessung an der wachsenden Bakteriensuspension. Optische Dichtemessungen werden weithin eingesetzt (Brettel et al, 1980; Dermoun und Belaich, 1979), um mikrobielles Wachstum zu beobachten, und liefern eine hinreichende Linearität. Die Berechnung des Zellwachstums erfolgte nach Umstellung von Gleichung 3.2., die das bakterielle Wachstum beschreibt (Herbert et al, 1956).

$$X(t) = X(t_0) e^{\mu t} \quad (Gl. 3.2)$$

$$\mu = \frac{\ln X(t) - \ln X(t_0)}{t - t_0}$$

### 3.6.1.1. Ausführung

Eine Vorkultur von *Acinetobacter calcoaceticus* oder *Escherichia coli* wurde von den Stammkulturen in 500 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml des Vorkulturmediums über Nacht im Schüttelinkubator bei 303 K herangezogen. Vor der Testausführung wurden 50 ml der Kultur mit 150 ml vortemperiertem Vorkulturmedium in einem 1000-ml-Erlenmeyerkolben weiter kultiviert. Sobald diese Kultur eine optische Dichte von 0.500 erreicht hatte, gemessen mit dem Shimadzu Photometer UV-120-2 bei 578 nm Wellenlänge mit Standard Kuvette, wurden damit die Testansätze beimpft.

Testansätze bestanden aus 16 ml vortemperiertem Vorkulturmedium, 2.0 ml der zehnfach konzentrierten Teststofflösung und 2.0 ml Inokulum von exponentiell wachsenden Bakterienzellen der optischen Dichte 0.500E in 50 ml Enghals Erlenmeyerkolben. Die Testansätze wurden in einem Wasserbad mit Schüttelvorrichtung bei 303 K inkubiert und über einen Zeitraum von 3 Stunden im Abstand von 30 Minuten auf die optische Dichte vermessen. Die Versuchsanordnung erlaubte die simultane Messung von 12 Ansätzen.

### 3.6.2. Atmungsraten Hemmtest

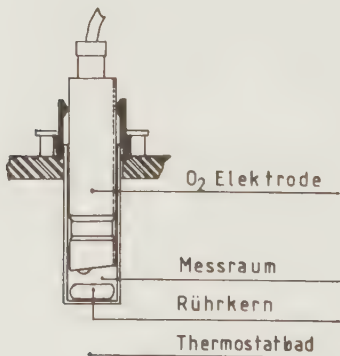
Die oben diskutierte enge Korrelation zwischen Respirationsrate und Wachstumsrate bei Mikroorganismen ziehen verschiedene Autoren heran, um momentane toxische Effekte zu erfassen. Reis et al, (1984) verwenden eine Kombination von Batch-Kalorimetrie und Respirometer zur Untersuchung von Bakteriensuspensionen sehr hoher Zelldichte. Die Verwendung von Sauerstoffelektroden mit registrierender Aufzeichnung des Konzentrationsverlaufes erleichtert diesen methodischen Ansatz erheblich (Slabbert und Morgan, 1982) und wurde von mir ebenfalls bereits angewendet (Weppen, 1983).

#### 3.6.2.1. Ausführung

Die Sauerstoffmeßzellen YSI-Modell 53, die auch von Slabbert und Morgan (1982) verwendet werden, wurden als Meßraum für die respirometrische Toxizitätsbestimmung herangezogen. Das Inokulum wurde über die Versuchsdauer bei 273 K gelagert, nachdem es, wie oben beschrieben gewonnen wurde. Diese Vorratshaltungstechnik war erforderlich, da mit den zwei verfügbaren Meßräumen eine sequentielle Anordnung der Einzeltests

erforderlich war. Respirometrische Tests wurden bei einer konstanten Temperatur von 303 K in Gesamtvolumina von 5 ml jeweils als Replikate ausgeführt, wobei ein Testansatz aus 0.5 bis 4.0 ml Zellsuspension, 4.0 bis 0.5 ml Vorkulturmedium sowie 0.5 ml der zehnfach konzentrierten Teststofflösung bestand. Die unterschiedlichen Einsätze an Zellsuspension wurden zur Einstellung definierter unterschiedlicher Zellkonzentrationen herangezogen. Alle Teststoffe mit Ausnahme von Quecksilber wurden nach einer zehnminütigen Vorinkubation zugegeben, woraufhin sofort die Aufnahme der Sauerstoffzehrungskurve begann. Besonderheiten bei der Untersuchung von Quecksilber werden später diskutiert. Die Meßzellenanordnung ist in Abbildung 3.6. dargestellt.

Die Anordnung von Tests innerhalb der erforderlichen Konzentrationsbereiche erfolgte in einem vollständig randomisierten Versuchsansatz, um eventuelle Alterungseinflüsse durch die Lagerung des Inokulums in zufällige Fehler zu überführen.



**Abbildung 3.6.:** Die respirometrische Meßstation (ungezeichnet nach Slabbert und Morgan, 1982). Der Meßraum wird von der Kunststoffhalterung der YSI-Sauerstoffelektrode luftblasenfrei gegen die Umgebung abgeschlossen, lediglich ein feiner Kanal sorgt für den notwendigen Druckausgleich mit der Umgebung. Die präzise Einhaltung der Meßtemperatur gewährleistet der Wasserbadthermostat mit einer hohen Umwälzleistung (wird extern an das Elektrodenthermostatbad angeschlossen).

### **3.6.3. Kinetischer Atmungsraten-Hemmtest**

Die Arbeit von Slabbert und Morgan (1982) zeigt die prinzipielle Möglichkeit auf, den zeitlichen Verlauf des toxischen Effektes einer Chemikalie mit Hilfe der Sauerstoffzehrungsmessung zu erfassen, womit die Möglichkeit gegeben ist, Einblicke in die Interaktion zwischen Teststoff und Organismen zu gewinnen.

#### **3.6.3.1. Ausführung**

Die Anordnung des respiratorischen Toxizitätstests wurde mit dem mikroprozessorgestützten Analog-Digitalwandler, der auch im Kalorimeter-Auswertungsverbund verwendet wurde, erweitert, um hochgenaue Messungen der Sauerstoffkonzentration über die Zeit zu erhalten, die sich für die Bildung einer ersten Ableitung über die Zeit eignen. Zur Erfassung des zeitlichen Verlaufes der Sauerstoffkonzentration wurde der Teststoff erst direkt vor dem Beginn der Messungen zu der Testsuspension hinzugefügt, so daß etwa 100 s nach Teststoffgabe zuverlässige Daten erhalten wurden. Die rechnerische Aufbereitung der Rohdaten erfolgte mit dem Programmpaket MEN auf einem IBM-Personal-Computer.

#### **3.6.4. Die Teststoffe**

Die verwendeten Teststoffe wurden als konzentrierte Stammlösungen mit 10000 mg Teststoff/l in Glasstöpselflaschen bereitgehalten. Stammlösungen von Chloranilin und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure wurden mit 1000 mg Teststoff/l und Quecksilber-II-Chlorid mit 100 mg/l entsprechend 73.9 mg Hg/l bereitgehalten. Die Phenole wurden unter Zusatz von äquimolaren Mengen NaOH gelöst. Stammlösungen von Phenol und 2,6-Dimethylphenol mußten vor jedem Gebrauch neu hergestellt werden, da die Komponenten selbst bei einer Lagertemperatur von 277 K eine rasche Veränderung zeigten.

Gebrauchsverdünnungen der Teststoffe wurden so gewählt, daß im logarithmischen Maßstab eine gleichförmige Verteilung mit acht Konzentrationsstufen pro Dekade vorlag. Diese Konzentrationsenteilung erfolgte mit Rücksicht auf gängige Anpassungsmodelle für toxikologische Datenauswertungen (Buikema et al, 1982; Chan et al, 1984).

### 3.6.5. Auswertung toxikologischer Referenztests

Die Bewertung von toxikologischen Tests mit dem Ziel einer statistischen Sicherung der Ergebnisse scheint für Tests auf akute Toxizität nur für eine mittlere effektive Konzentration [EC 50] unter Angabe von Vertrauensbereichen und der Steigung der Konzentrations-Wirkungskurve valide zu sein (Chan et al, 1984; Buikema et al, 1982). Zuvor ist eine Datentransformation erforderlich, da eine lineare Konzentrations-Wirkungs-Kurve normalerweise stark sigmoid verformt ist und einer sinnvollen Auswertung kaum zugänglich ist. Ein allgemein anerkanntes Transformationsverfahren ist die Log-Probit-Transformation, wobei die Konzentrationen in einen logarithmischen Maßstab überführt werden und die relativen Responsedaten so dargestellt werden, daß die Prozentzahlen für Vielfache der Varianz einer Standard-Normalverteilung linearisiert erscheinen. Für graphische Auswertungen stehen sogenannte Wahrscheinlichkeitsnetzpapiere zur Verfügung (Chan et al, 1984).

Dieses Verfahren der Toxizitätsbewertung ist zuweilen nicht anwendbar, wenn z.B. die Konzentrations-Wirkungskurve in der transformierten Darstellung nicht linearisiert erscheint, was nach Buikema et al (1982) die verschiedensten Gründe haben kann. Ein wesentlicher Problempunkt der statistischen Bewertung von Toxizität nach dem genannten Verfahren scheint mir die zugrundeliegende Annahme zu sein, von einer Testpopulation mit LOG-Normal verteilter Resistenz oder Sensitivität auszugehen, was sicherlich zumindest dann nicht uneingeschränkt gelten kann, wenn ein Teststoff mehrere verschiedene Wirkeffekte in einem Organismus hervorruft, die sich zu einem Gesamtbild von Toxizität überlagern. Dieser Aspekt soll später noch eingehender diskutiert werden.

Eigene Screening-Testergebnisse wurden soweit möglich nach dem Verfahren der Probit-Analyse (Chan et al, 1984) ermittelt. Wenn Abweichungen in der Konzentrations-Wirkungskurve auftraten, so wurden entsprechende Anmerkungen und Schätzwerte für die mittlere effektive Konzentration angegeben. Das Konzept der toxischen Grenzkonzentration, das von Bringmann und Kühn in verschiedenen Arbeiten angewendet wird, hält einer eingehenden statistischen Prüfung kaum stand. Obschon in eigenen Arbeiten (Weppen, 1983; Weppen und Schuller, 1984a; Schuller und Weppen, 1984) von dieser Form der Toxizitätsbewertung Gebrauch gemacht wurde, soll darauf hier zugunsten gesicherter Methoden verzichtet werden.

Die Interpretation von Untersuchungsergebnissen am Biokalorimeter wirft weitere Fragen auf, da die Konzepte der Akut-Toxizitätsbewertung auf Zeitreihenanalysen nicht übertragbar sind, was an entsprechender Stelle näher diskutiert werden soll.

#### **4. Qualitätssicherung der analytischen Techniken**

Die Absicherung analytischer Verfahren wird zuweilen etwas vernachlässigt, nicht zuletzt wohl wegen des Aufwandes, der zu den Zielen einer Untersuchung wenig beiträgt. Unabhängig hiervon ist die Methodensicherung Bestandteil eines guten experimentellen Designs und die Gewähr für glaubwürdige Arbeitsergebnisse. Wichtige Kenngrößen einer quantitativen Analytik sind neben den Nachweisgrenzen und Standardabweichungen die Additivität und Freiheit von Matrixstörungen (Zauke und Höpner, 1982).

Besondere Sorgfalt bei der Absicherung einer Analytik muß man erwarten, wenn Analysengeräte, wie in dieser Arbeit das Biokalorimeter, aus eigener Entwicklung stammen, weil die Konstruktion die apparativen Leistungsmerkmale festlegt. Eine kurze Beschreibung der apparativen Seite ist zum Verständnis notwendig.

##### **4.1. Das Kalorimetrische System**

Unser Wärmeleitungs-Biokalorimeter ist eine hauseigene Prototypentwicklung, die mit Kalorimetern industrieller Anbieter nur wenig Gemeinsamkeiten aufweist. Definierte Wärmeleitung zwischen Meßraum und isothermer Umgebung wird im Gegensatz zu zahlreichen marktüblichen Geräten nicht durch Thermoelementsäulen (vgl. Wadsö, 1980; Hemminger und Höhne, 1979; Pamatmat, 1978; Ishikawa et al, 1981), sondern durch einen massiven Metallstab realisiert, in dem direkt unterhalb der Meßzelle ein Silizium-Transistor zur Messung der Temperaturdifferenz zum Referenzmessraum angeordnet ist. Die Verwendung von Si-Dioden-Thermometern hat erst in jüngerer Zeit zunehmende Bedeutung z.B. in der Tieftemperaturmessung erlangt (Rao et al, 1983). Eine detaillierte Beschreibung des Kalorimetersystems liegt bereits vor (Weppen, 1983; 1985) und soll hier unterbleiben, einige wichtige, meßtechnisch bedeutsame Parameter sollen jedoch knapp dargestellt werden, da ihre Behandlung gegenüber früheren Versionen zum Teil modifiziert wurde.

#### 4.1.1. Einflußgrößen aus dem Luft- und Mediumdurchfluß

Flow-Kalorimeter beruhen prinzipiell auf dem Durchfluß des Probengutes durch die kalorimetrische Meßzelle, womit die Möglichkeit verbunden ist, eben diesen Durchfluß zu verändern. Untersuchungen an Chemostaten mit marktgangigen Flow-Kalorimetern finden zumeist in Form der Koppelung eines Fermenters mit eigener Instrumentierung und eines Flow-Kalorimeters statt, so daß eine Kalibrierung des Kalorimeters für eine gegebene Durchflußrate durch das Flow-Kalorimeter ausreicht, während der Chemostat bei frei wählbarer Dilution-Rate betrieben werden kann (Cardoso-Duarte et al, 1976; Brettel, Lamprecht und Schaarschmidt, 1981). Dieses Konzept weist gewisse Mängel aufgrund der Verweilzeit der Probe in den Verbindungen zwischen Kalorimeter und Chemostat auf, die nur unter steady-state Bedingungen mit Hilfe von Korrekturrechnungen eliminierbar sind.

Unser Konzept nutzt die Kalorimetermeßzelle direkt als Bioreaktor für die Chemostatkultur, so daß die Richtigkeit der kalorimetrischen Messung bei beliebiger Wahl der Dilution-Rate gewährleistet sein muß, um das Instrument wirkungsvoll einzusetzen. Nach eigenen Ergebnissen (Weppen, 1983) lassen sich Korrekturen für die Wärmeleitung und Zeitkonstante der Abkühlungsfunktion als einfache lineare Funktion der Medium-Flow-Rate beschreiben.

Poore und Beezer (1983) finden für ein kommerzielles Wärmeleitungs-Flow-Kalorimeter eine lineare Abnahme der Empfindlichkeit mit steigendem Flow und eine entsprechende Änderung der Zeitkonstante, die als substantieller systematischer Fehler beachtet werden müssen. Ishikawa und Shoda (1983) finden ebenfalls eine Abnahme der Empfindlichkeit ihres Kalorimeters bei steigendem Flow, berücksichtigen diesen Effekt jedoch nicht weiter, da das verwendete Kalorimeter baubedingt eine sehr hohe Wärmeleitung zwischen Meßraum und Umgebung besitzt.

Eine weitere Störgröße kalorimetrischer Messungen stellt der Eintrag von Luft dar, der mehrere verschiedene Effekte mit sich bringt, wie die Verdampfung kleiner Mengen Wasser, mechanische Rührleistung, Änderung des Flüssigvolumenanteiles in der Meßzelle oder Volumenarbeit. Diese Störgrößen werden zumeist dem zufälligen Fehler der kalorimetrischen Messung zugeschlagen (Wadsö, 1980) und nicht nach systematischen Gesichtspunkten untersucht.

#### 4.1.2. Thermogramm und wahre Wärmestromfunktion

Ein ganz wesentlicher Nachteil der Wärmeleitungskalorimetrie resultiert aus der Verschmierung von Wärmestrommessungen schneller Prozesse aufgrund der physikalisch gegebenen Übertragungsfunktion dieses Kalorimetertyps. In der Kalorimetrie werden gerne elektrische Ersatzschaltbilder zur Beschreibung des physikalischen Verhaltens der Geräte herangezogen. Das elektische Analogon eines Wärmeleitungskalorimeters ist in erster Näherung ein passiver Tiefpaß erster Ordnung. Gleichung 4.1. beschreibt den Zusammenhang zwischen meßbarer örtlicher Temperaturdifferenz und dem Wärmestrom. Man erkennt deutlich, daß ein Thermogramm nur bei vernachlässigbarer Änderung der Differenztemperatur ( $d\Delta T \approx 0$ ), oder allgemeiner in allen Fällen, in denen der zweite Term der Gleichung wesentlich kleiner als der erste ist, direkt proportional zum Wärmestrom verläuft.

$$\dot{Q} = \alpha \Delta T + \beta d\Delta T/dt \quad (\text{Gl. 4.1})$$

Darin ist  $\alpha$  die Wärmeleitfähigkeit zwischen Meßzelle und Umgebung und  $\beta$  die Wärmekapazität der Meßzelle (Randzio und Suurkuusk, 1980; verändert). Die Gleichung kann unter Verwendung der Zeitkonstante  $\tau_1$ , die für einen passiven Tiefpaß erster Ordnung steht, umgeschrieben werden (Gl. 4.2.) und erscheint dann in der gewohnten Form der **Tian-Gleichung**.

$$\tau_1 = 1/\alpha * \beta$$

$$\dot{Q} = \alpha (\Delta T + \tau_1 * d\Delta T/dt) \quad (\text{Gl. 4.2.})$$

Wie bereits früher diskutiert wurde, entspricht die Näherung der kalorimetrischen Übertragungsfunktion durch einen Tiefpaß erster Ordnung der beobachtbaren Übertragungsfunktion des Wärmeleitungskalorimeters nicht vollständig, da neben dem Wärmeübergang über die Wärmeleitstrecke mindestens noch der Wärmeübergang von der Probe zum Meßsystem von Bedeutung ist (vgl. Hemminger und Höhne, 1979). Eine Verbesserung kann durch Einbeziehung einer zweiten Zeitkonstante in die Gleichung 4.2. erreicht werden, wie bei Randzio und Suurkuusk (1980) hergeleitet wird.

$$\dot{Q} = \alpha \left[ \Delta T + (\tau_1 + \tau_2) \frac{d\Delta T}{dt} + \tau_1 \tau_2 \frac{d^2 \Delta T}{dt^2} \right] \quad (\text{Gl. 4.3.})$$

Die Zeitkonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  können nach Randzio und Suurkuusk (1980) zum Beispiel durch Vermessen der Reaktion nach einer sehr schnellen Freisetzung von Wärme im Meßraum ermittelt werden. dabei stimmt  $\tau_1$  recht gut mit den Ergebnissen aus der einfachen Abkühlfunktion des Kalorimeters überein. Die Konstante  $\tau_2$  ist aus der Anstiegsflanke nach der impulsartigen Freisetzung von Wärme näherungsweise zu bestimmen als die halbe Halbwertsbreite (Hemminger und Höhne 1979) und ist erwartungsgemäß wesentlich kleiner als  $\tau_1$ .

Da eine Vernachlässigung der Verzerrung kalorimetrischer Messungen an der Chemostatkultur unter Belastung mit Teststoffen nicht sinnvoll ist, sollen die notwendigen Kenngrößen ermittelt werden, soweit sie noch nicht aus früheren Arbeiten vorliegen.

## 4.2. Spezifische Kennwerte des Prototyp-Kalorimeters

### 4.2.1. Steady State Wärmeleitkoeffizient des Kalorimeters

Der Kalibrierfaktor  $\alpha$  aus Gleichung 4.2., der sich meßtechnisch aus der Temperaturdifferenz zu einem gegebenen konstanten Wärmestrom als asymptotischer Grenzwert erfassen läßt, soll im Idealfall über einen großen Bereich von Wärmeströmen konstant sein (Linearität).

Die Kalibriermessungen ergaben eine Geradengleichung mit sehr gutem Korrelationskoeffizienten (Tabelle 4.1.) und einem mittleren Wert von  $\alpha = 0.2859 \text{ W/K}$ . Eine genauere Analyse anhand der Auftragung der Wärmeleitwerte gegen die steady state Differenztemperatur deutete aber eine Nichtlinearität an, die nach Gleichung 4.4. korrigiert werden konnte. Details wurden von mir bereits früher dargestellt (Weppen, 1983).

$$\alpha = \alpha_0 + \alpha(\Delta T)$$

$$\alpha_0 = 0.2261 \text{ W/K}$$

$$\alpha(\Delta T) = 0.008496 \sqrt[3]{\Delta T} \text{ W/K} \quad (\text{Gl. 4.4.})$$

Tabelle 4.1.: Übertragungsdaten des Prototyp-Kalorimeters und ihre Beschreibung als Geradengleichungen der Form  $Y = mX + b$

| Funktion                  | Koeffizienten der Geradengleichung                                                                        | r      | 95% CV <sup>2</sup> der Residuen | n  | Residuen Verteilung                                                               | Kommentar                                                                                                                    |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|----------------------------------|----|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\Delta T = f(\dot{Q})$   | $m = 3.498 \text{ K}/\omega$<br>$b = 5.2 \text{ mK}$<br>$x = \dot{Q} \text{ mJ/s}$                        | 0.9998 | —                                | 30 |  | Gemessene Basisbeziehung zwischen $\dot{Q}$ und Differenztemperatur $\Delta T$ (stationärer Zustand)                         |
| $\alpha = \text{Konst.}$  | $m = 0$<br>$b = 0.267 \text{ W/K}$                                                                        | —      | $\pm 0.0234$<br>$\pm 8.74 \%$    | 30 |  | Auswertung der Funktion $\Delta T = f(Q)$ nach Wärmeleitfähigkeitsdaten                                                      |
| $\alpha = f(\Delta T)$    | $m = 0.00849 \text{ W/K}$<br>$b = 0.226 \text{ W/KmK}^{1/3}$<br>$x = \sqrt[3]{\Delta T} \text{ mK}^{1/3}$ | 0.9697 | $\pm 2.36 \%$                    | 30 |  | empirisch gefundene Anpassung der Wärmeleitfähigkeitsdaten in Abhängigkeit von der Differenztemperatur                       |
| $\alpha = f(\text{Flow})$ | $m = 4.356 \text{ J/ml K}$<br>$b = \alpha(\Delta T) \text{ W/K}$<br>$x = \text{Flow} \text{ ml/s}$        | 0.9935 | $\pm 4.7 \%$                     | 18 |  | Wärmeleitwert $\alpha$ und Medium Flow korrelieren nach einer linearen Beziehung                                             |
| $\tau_1 = f(\alpha)$      | $m = 995$<br>$b = 10.6 \text{ s}$<br>$x = 1/\alpha \text{ Ks/J}$                                          | 0.951  | $\pm 15.9 \%$                    | 25 |  | Die kalorimetrische Zeitkonstante erster Ordnung verläuft ungekehrt proportional zu $\alpha$ , d.h. $\beta$ ist konstant (m) |

§ Der Vertrauensbereich der Residuen wurde nach folgender Methode bestimmt:

Residuum (%) =  $(V_{\text{calc.}} - V_{\text{gemessen}}) / V_{\text{calc.}}$  // calc. heißt berechnet nach der Anpassungsgeraden  
Für diese Residuen wurde der Vertrauensbereich unter Annahme einer Normalverteilung berechnet.

Darin wird  $\Delta T$  in mK angegeben. Die Korrekturgleichung wurde rein empirisch ermittelt und besitzt demnach auch nur Gültigkeit für exotherme Reaktionen. Innerhalb kleinerer Meßbereiche wirkte sich die Nichtlinearität kaum bemerkbar aus, so daß näherungsweise von einem linearen additiven Verhalten des Systems ausgegangen wurde.

#### **4.2.2. Medium-Flow und Wärmeleitkoeffizient Medium-Flow und Zeitverhalten**

Wie oben bereits diskutiert wurde, besteht ein systematischer Zusammenhang zwischen Medium-Durchsatz und Wärmeleitwert des Kalorimetersystems. Der gefundene Zusammenhang zwischen Flow-Rate und Wärmeleitwert war nach den Ergebnissen (Tabelle 4.1.) streng linear und ließ sich als einfache Gleichung beschreiben.

$$\alpha(\text{Flow}) = 4.356 \cdot \text{Flow} \quad [\text{J/K}] \quad (\text{Gl. 4.5.})$$

Darin ist der Medium Flow in ml/s anzugeben. Der Koeffizient von 4.356 lag sehr nahe bei der spezifischen Wärme von Wasser, so daß die Wärmeleitfähigkeit, die aus dem Medium-Durchsatz resultierte, plausibel mit dem Transport von Wärmekapazität durch das Meßsystem zu erklären war.

Das Zeitverhalten nach der Zeitkonstante  $\tau_1$  konnte aus den Kalibrierversuchen kalkuliert werden. Unter Zugrundelegung einer konstanten Wärmekapazität der Kalorimetermeßzellen wurde eine lineare Korrelation zwischen Zeitkonstante und thermischem Widerstand ( $1/\alpha$ ) zwischen Meßzelle und Umgebung erwartet. Die Geradengleichung in Tabelle 4.1. bestätigt diese Annahme, so daß mit einer Wärmekapazität von 995 J/K für die Messzellen gerechnet werden konnte.

#### **4.2.3. Luftdurchsatz und Basislinie**

Thermische Effekte aufgrund der Belüftung der Kalorimetermeßzelle wurden nach den o.g. Gesichtspunkten erwartet. Eine hierzu ausgeführte Basislinien-Versuchsreihe erbrachte die Ergebnisse, die in Abb. 4.1. dargestellt sind. Die Belüftungsrate der kalorimetrischen Referenzzelle wurde bei 2,7 ml/s konstant gehalten, was zu dem entsprechenden Schnittpunkt für  $\Delta T=0$  führte.

Ausgehend von einem äquiliбриerten System verschob sich die Basislinie mit steigenden Luftdurchsätzen zu negativen  $\Delta T$  Werten, was bedeutet, daß die endothermen Anteile als Störgrößen überwogen, wie es bereits früher diskutiert wurde (Weppen, 1983). Das Versuchsergebniss weist darauf hin, daß die Störeffekte aus der Belüftung präzise beschreibbar sind, wozu eine Bestimmung des Luft-Flow-Wertes und des Differenzdruckes an der Filterkerze in der Meßzelle erforderlichlich sind, während der Experimentalphase standen aber keine Hilfsmittel zur registrierenden Erfassung der beiden Größen zur Verfügung, so daß nur eine genaue Einstellung der Bedingungen während der System Äquilibrierung zur Vermeidung von Meßfehlern beitragen konnte.

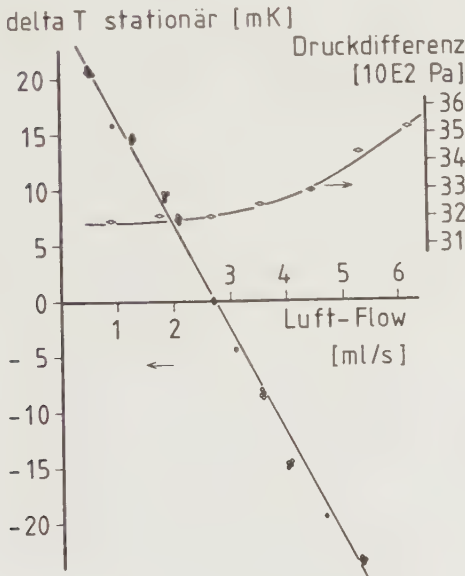


Abbildung 4.1.: Der Einfluß der Kalorimeter-Meßzellenbelüftung auf die Lage der Basislinie. Die Referenzzelle wurde bei einer Luft-Flow-Rate von 2.66 ml/s gehalten, während die Meßzelle mit verschiedenen stationären Belüftungsraten betrieben wurde. Ein  $\Delta T$  von 20 mK entspricht etwa 5 mW stationärem Wärmestrom bezogen auf das Meßzellenvolumen. Die Differenzdruckkurve für die Belüftung war nahezu unabhängig von der Luft-Flow-Rate, was die Linearität der Messreihe erklärt. Der beobachtete Effekt der Belüftung auf die Basislinie scheint als Summe der Effekte aus mechanischer Arbeit (exotherm) und Joule-Thomson Effekt (endotherm) hinreichend erklärbar zu sein (vgl. Weppen, 1983).



#### **4.2.4. Luftdurchsatz und Wärmeleitfähigkeit Luftdurchsatz und Zeitverhalten**

Unter den bisherigen Betrachtungen wurde der Durchsatz an Luft durch die Kalorimeterzellen bei einem Standardwert von 2.7 ml/s festgelegt. Um die Frage zu klären, ob Änderungen des Luftstromes zu einem Wärmeleitwärtsbeitrag führen, wurden entsprechende Messwerte erhoben, die in Tab. 4.2. zusammengestellt sind. Ausgehend von den Werten für den Wärmeleitwert  $\alpha$  und die Zeitkonstante  $\tau_1$  und deren Vertrauensbereichen konnten keine Ansätze für eine systematische Korrektur gebildet werden, dies muß eingehenderen apparativen Studien vorbehalten bleiben. Der Effekt auf die Wärmeleitung schien zwar recht deutlich zu sein, präzisere Messreihen mit höheren Warmestromen und breiter variierten Belüftungsraten sind aber zur quantitativen Bewertung notwendig. Unter dem Gesichtspunkt der angestrebten Anwendungen wurden alle erforderlichen Kalibrierungen bei einer Belüftungsrate von 2.7 ml/s ausgeführt.

#### **4.2.5. Zeitkonstanten höherer Ordnung**

Die Zeitkonstanten höherer Ordnung treten nach den obigen Ausführungen vor allem bei sehr schnellen Prozessen in Erscheinung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das vereinfachte Verfahren nach Hemminger und Hohne (1979) angewendet, wozu Eichwärmen innerhalb kurzer Zeitspannen in der kalorimetrischen Meßzelle freigesetzt wurden. Die Superposition von fünf Thermogrammen ergab eine Mittelwertkurve (Abb. 4.2.), die eine Abschätzung von  $\tau_2$  zu etwa 130 Sekunden erlaubte. Eine genauere Bestimmung dieser oder weiterer Zeitkonstanten höherer Ordnung erfordert die Bestimmung der Frequenz-Transferfunktion mit sinusförmig oszillierenden Kalibrierleistungen, die nicht verfügbar waren. Zudem ist das Verfahren mathematisch aufwendig (Hemminger und Hohne, 1979; Randzio und Suurkuusk, 1980; Rodriguez, et al, 1984).

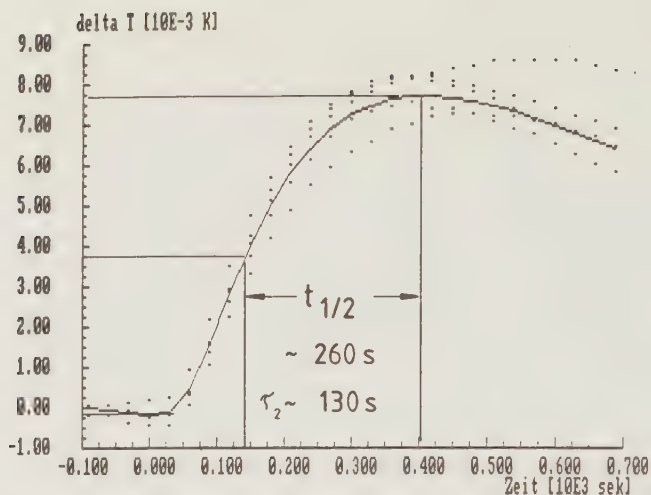


Abbildung 4.2.: Bestimmung der Zeitkonstante  $\tau_2$  nach dem Näherungsverfahren von Hemminger und Hohne (1979). Eine nahezu momentane Freisetzung von 7.07 Joule Wärme (Widerstand) bei  $t=0$  führte zu dem aus fünf Einzelversuchen (Punktreihen) gemittelten Thermogramm, in dem die Halbwertsbereiche und die abgeschätzten Zeitwerte eingetragen sind.

#### 4.2.6. Zusammenfassung der kalorimetrischen Kenndaten

Wie oben gezeigt wurde, ließen sich einige Störeinflüsse am kalorimetrischen System als quantitativ modellierbare Variablen erfassen, hiervon ausgenommen sind Störeinflüsse auf die Basislinie aus der Belüftung der Kalorimeterzellen, wenn sich, für den Benutzer nicht feststellbar, Änderungen der Differenzdruckbedingungen an der Glasfilterkerze einstellen, was jedoch in erster Linie ein Instrumentierungsproblem ist. Die systematische Erfassung von Abhängigkeiten zwischen Belüftungsrate und den Gerätekonstanten erbrachte keine signifikanten Resultate, um dennoch mögliche systematische Fehler zu vermeiden, wurden alle Versuche an Chemostaten unter Standardbedingungen ausgeführt.

Unter pragmatischen Gesichtspunkten kamen zwei Transformationsansätze für Thermogramme zur Anwendung; zum einen eine Differenzenquotientenzerlegung zur Berechnung der Tian-Transformation mit  $\tau_1$  erweitert um Korrekturterme (Gl. 4.6.), zum anderen eine Transformation mit den Zeitkonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$ , für die die erste und zweite Ableitung des Thermogramms mittels Spline-Berechnung bereitgestellt wurde. Beide Rechenverfahren sind Bestandteil des Softwarepaketes MEN.

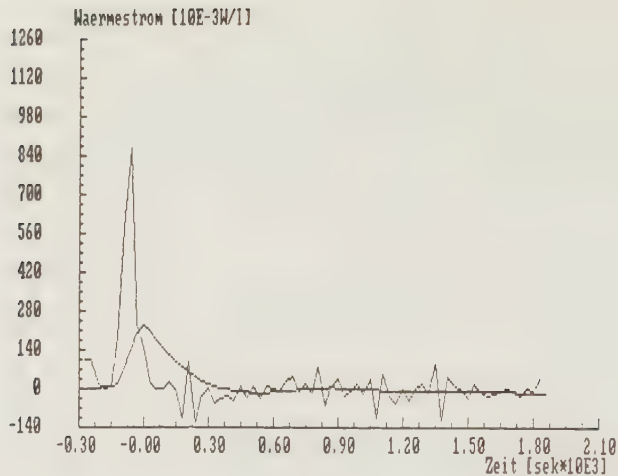
$$\alpha = \alpha_0 + \alpha_{\Delta T} + \alpha_{\text{Flow}}$$

$$\dot{Q} = \alpha \frac{\Delta T_1 + \Delta T_2}{2} + \frac{\Delta T_2 - \Delta T_1}{t_2 - t_1} \beta \quad (Gl. 4.6)$$

$$\dot{Q} = \alpha \left[ \Delta T + (\tau_2 + \beta/\alpha) \frac{d\Delta T}{dt} + \tau_2 \beta/\alpha \frac{d^2 \Delta T}{dt^2} \right] \quad (Gl. 4.7)$$

Eine exemplarische Demonstration der Wirkung beider Transformationen gibt Abb. 4.3. anhand eines sehr schnellen thermischen Ereignisses, in dem die prinzipiellen Unterschiede vor allem dadurch deutlich werden, daß große differentielle Anteile auftraten. Sprungfunktionen kommen in der Anwendung sonst nur selten vor.

Die Transformation von Thermogrammen nach Gl. 4.6. erwies sich für die Transformation von Messreihen mit Datenabständen von 180 bis 360 Sekunden als vorteilhaft, da eine hinreichende Elimination der Dämpfung in Verbindung mit einem niedrigen Transformationsrauschen erzielt wurde. Das Verfahren nach Gl. 4.7. eignete sich gut zur Rücktransformation von sehr schnellen thermischen Ereignissen, wenn eine hohe Sampling-Rate benutzt wurde (z.B. 30 Sekunden), wie Abbildung 4.3. belegt. Zur Untersuchung biologischer Systeme war das Verfahren jedoch ungeeignet, da im OFF-LINE-Betrieb eine hohe Sampling-Rate nicht praktikabel war und ein erhebliches Transformationsrauschen die Wärmestrom-Zeit-Funktion überlagerte.



**Abbildung 4.3.: Fallbeispiel für die Anwendung der Transformationen nach Gl. 4.6. (Tian-Gleichung) und Gl. 4.7. (erweitert um Zeitkonstante  $\tau_2$ ) (siehe Text). Ein Wärmestrom von 1700 mJ/s l wurde für die Zeit von 30 s freigesetzt und mit einer Sampling-Rate von 1/30 s erfaßt und transformiert. Aufgrund der großen differentiellen Anteile erzielte die Transformation nach dem zweiten Verfahren die bessere Anpassung, sie ist aber für die Routinemessung aufgrund des hohen Transformationsrauschens nicht geeignet.**

### 4.3. Die Fettsäureanalytik

Die gaschromatographische Fettsäureanalytik wurde mit Hilfe von Kunststandards in verschiedenen Matrices getestet. Tabelle 4.3. zeigt Ergebnisse von Kalibrierungsversuchen mit Standards in Bidest-Wasser und in Seewasser, das ausgewählt wurde, um einen hohen Mineralstoffgehalt in der Matrix zu erhalten. Die Geradensteigungen waren in den verschiedenen Matrices für identische Säulenbedingungen nahezu identisch und Korrelationskoeffizienten von besser 0.99 waren der Regelfall. Standardadditionsversuche mit Vorkulturmedium für *Escherichia coli* sowie mit Zellsuspensionen von *E. coli* erbrachten ebenfalls gleichartige Ergebnisse, so daß mit erheblichen Matrixproblemen z.B. durch die Zellbestandteile oder Mineralstoffe nicht gerechnet werden mußte. Zellsuspensionen ergaben gleiche Konzentrationswerte, unabhängig davon, ob die Zellen zuvor abgetrennt wurden oder nicht.

Als wesentliche Randbedingung mußte die Einhaltung exakter Aquilibrierungstemperaturen für die Headspace-Proben gewährleistet werden, da diese Temperatur über den Dampfdruck der Komponenten erheblichen Einfluß auf die Steigung der Kalibriergeraden besaß.

#### 4.3.1. Bewertung

Die Austestung verschiedener Säulenmaterialien zeigte einen prinzipiellen Unterschied zwischen den belegten Materialien (PEG 6000, PEG 2000) und dem Sorptionstrennmittel Porapak Q. Die Verwendung von Porapak Q erwies sich für die Routine als zeitraubend und wenig wirkungsvoll, da ein Temperaturprogramm verbunden mit langen Chromatogrammlaufzeiten notwendig war. Der Vorteil lag in der prinzipiellen Möglichkeit, Propion- und Buttersäure zu erfassen, was mit den PEG-Materialien nicht möglich war, da die entsprechenden Retentionszeitbereiche unter dem Peak des Methanols verdeckt wurden. Dieser Vorteil wurde jedoch mit einer schlechten Trennung von Methanol und Methylformiat erkauft.

In den Testversuchsreihen konnten keine prinzipiellen analytischen Schwierigkeiten aufgedeckt werden, Standardadditionen ergaben regelmäßig die geforderte Additivität sowohl für Ameisensäure als auch Essigsäure.

TABELLE 4.3.: Die Analytik von Ameisensäure und Essigsäure als Methyformiat und Methylacetat auf Polyethylenglycol 6000 oder PEG 20000.  
Die Kalibrierungsergebnisse sind als Geradengleichungen der Form  
 $\text{Peak-Area} = m \cdot [\text{Konz}] + b$  angegeben.

| ESSIGSÄURE                 |      |      |        |    | abs.<br>mittl.<br>Fehler | Kommentar                           |
|----------------------------|------|------|--------|----|--------------------------|-------------------------------------|
| Kalibrierbereich<br>µMol/l | m    | b    | r*     | n# |                          |                                     |
| 0 - 1200                   | 0.72 | 14.5 | 0.9947 | 15 | 27                       | 37 µM PEG 6000 Bidest-Standards     |
| 0 - 122                    | 0.76 | 0.55 | 0.9683 | 27 | 7.7                      | 10 µM PEG 6000 Bidest-Standards     |
| 0 - 122                    | 0.69 | 4.2  | 0.9972 | 18 | 2.1                      | 3 µM PEG 6000 Seewasser-Standards   |
| 0 - 609                    | 1.29 | 5.5  | 0.9957 | 7  | 29                       | 22 µM PEG 20000 Bidest-Standards    |
| 0 - 61                     | 1.30 | 2.7  | 0.9986 | 12 | 1.6                      | 1.23µM PEG 20000 Bidest-Standards   |
| AMEISENSÄURE               |      |      |        |    |                          |                                     |
| 0 - 2200                   | 0.62 | 4.8  | 0.9989 | 16 | 12                       | 19 µM PEG 6000 Bidest-Standards     |
| 0 - 131                    | 0.68 | 1.6  | 0.9941 | 27 | 3.1                      | 4.5 µM PEG 6000 Bidest-Standards    |
| 0 - 131                    | 0.78 | 7.6  | 0.9859 | 17 | 5.7                      | 7.3 µM PEG 6000 Seewasser-Standards |
| 0 - 660                    | 1.05 | 0.2  | 0.9967 | 7  | 22                       | 21 µM PEG 20000 Bidest-Standards    |
| 0 - 66                     | 0.95 | 1.5  | 0.9973 | 10 | 1.4                      | 1.5 µM PEG 20000 Bidest-Standards   |

\* r ist der Korrelationskoeffizient für die lineare Korrelationsanalyse der Kalibrierreihe  
# n ist die Anzahl der Proben innerhalb der Kalibrierreihe  
\$ sd ist die Standardabweichung der Yi für die Kalibrierreihe  
\$ \$ der absolute mittlere Fehler ist die Standardabweichung für eine mittlere Probenkonzentration

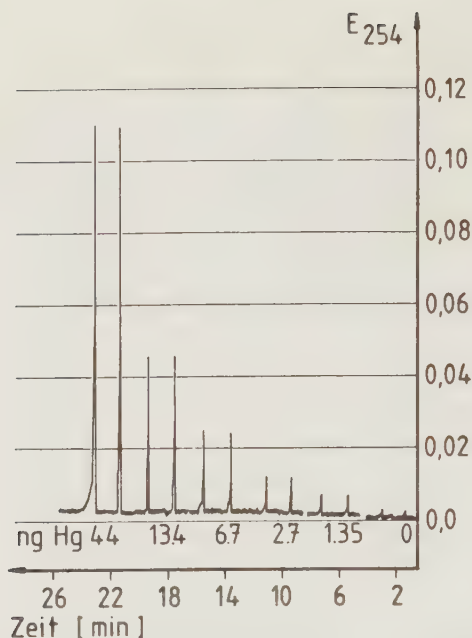
Die Nachweisgrenze konnte gegenüber den früheren Direktbestimmung (Weppen, 1985) etwa um den Faktor 20 erhöht werden und lag in den verschiedenen Matrices für Essigsäure und Ameisensäure durchweg bei etwa 10  $\mu\text{Mol/l}$ . Die Fehlerbreite von Einzelmesswerten betrug 3 bis 5% und lag im Erwartungsbereich für die Gaschromatographie. Besonderes Augenmerk verdienten die Reagenzienblindwerte, da die Chemikalien bei ungünstiger Exposition (insbes. NaOH und Methanol) leicht erhebliche Mengen der ubiquitär verteilten Substanzen Ameisensäure und Essigsäure aufnehmen konnten. Die Trennung auf PEG 20000 erwies sich als effektiver als die Arbeit mit PEG 6000, sowohl hinsichtlich der Reproduzierbarkeit als auch der Langzeitstabilität der Trennphase.

#### **4.4. Quecksilberanalytik**

Die Quecksilberanalytik in dieser Arbeit mußte in den spurenanalytischen Bereich von einigen nMol Hg/l hinabreichen. Eine Prüfung der analytischen Wiederfindung, der Nachweisgrenzen und von Matrixproblemen war demnach unvermeidbar.

##### **4.4.1. Kalibrierungsversuche und absolute Nachweisgrenzen**

Das CVAAS-Verfahren zur Bestimmung von Hg wurde in unserer Arbeitsgruppe parallel mit verschiedenen Geräten betrieben, zum einen mit dem Kaltdampfsystem MHS-20 an der AAS 300S (beides Perkin Elmer) zum anderen mit dem oben beschriebenen Literaturnachbau. Typische Messergebnisse mit dem Nachbausystem zeigt Abbildung 4.4. Die Kalibrierversuche an beiden Geräten sind dort ebenfalls gegenübergestellt. Aufgrund der optimierten Volumenverhältnisse erreichte das Nachbausystem eine wesentlich höhere absolute Empfindlichkeit bei guter Linearität. Die Analysendauer war wesentlich kürzer als auf dem MHS-20 System. Der Rauschpegel der Extinktionsmessung betrug etwa 2 mE, was eine Nachweisgrenze bei 5,2 mE (Irrtumswahrscheinlichkeit 1%) oder entsprechend 1,7 ng Hg absolut bedeutete.



**Abbildung 4.4.: Typisches Recorderdiagramm einer CYAAS-Messung von Quecksilber mit dem Literaturnachbau.**

Das Meßverfahren lieferte für den Bereich von 0-50 ng Hg eine lineare Beziehung zwischen Peak-Extinktion und absoluter Hg-Menge nach der Gleichung:

$$Y = 3.08 X + 1.012 \text{ mE} \quad n=18 \quad r=0.9996 \quad s=2.4 \text{ mE}$$

Das Standard-Meßverfahren der Firma Perkin-Elmer lieferte die Beziehung (Bereich 0-500 ng Hg absolut):

$$Y = 0.75 X + (-3.8 \text{ mE}) \quad n=19 \quad r=0.9964 \quad s=11 \text{ mE}$$

Die Daten zum Perkin-Elmer System wurden freundlicherweise von B. Schröter-Schuller und C. Thies bereitgestellt.

#### 4.4.2. Wiederfindungsdaten der verschiedenen Aufschlußverfahren für Referenzstandards

Tabelle 4.4. zeigt Wiederfindungsversuche für Hg in verschiedenen Referenzstandards der Europäischen Gemeinschaft. Die Aufschlüsse wurden mit Substanzmengen von  $100\text{mg} \pm 10 \text{ mg}$ , die auf  $\pm 0.2 \text{ mg}$  eingewogen wurden und mit  $1000 \mu\text{l}$  Bidestwasser angefeuchtet wurden, entsprechend den Angaben in Kap. 3 ausgeführt. Der Permanganat-Aufschluß erwies sich als unbrauchbar,

da das Oxidationsmittel schon nach wenigen Minuten vollständig verbraucht wurde. Von den übrigen Verfahren zeigte der Aufschluß mit Schwefelsäure/Salpetersäure die besten Ergebnisse.

**Tabelle 4.4.: Wiederfindung von Hg in BCR-Standard-Referenzmaterialien mit den verwendeten Aufschlußmethoden.**

| Aufschluß<br>methode                            | Referenzmaterial<br>BCR-Standards                     | gefundener<br>Hg-Gehalt<br>[µg Hg/g] | Wiederfindung<br>[ % ] |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| KMnO <sub>4</sub>                               | <i>Olea europaea</i> <sup>§</sup><br>280 ± 20 ng Hg/g | — *<br>— *                           | —<br>—                 |
|                                                 | Sewage sludge <sup>\$</sup><br>8820±880 ng Hg/g       | — *<br>— *                           | —<br>—                 |
| HNO <sub>3</sub>                                | <i>Olea europaea</i>                                  | 274                                  | 97.8                   |
|                                                 |                                                       | 257                                  | 91.8                   |
|                                                 | Sewage sludge                                         | 5692                                 | 64.5                   |
|                                                 |                                                       | 6245                                 | 70.8                   |
| HNO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | <i>Olea europaea</i>                                  | 296                                  | 105.7                  |
|                                                 |                                                       | 293                                  | 104.6                  |
|                                                 | Sewage sludge                                         | 7417                                 | 84.1                   |
|                                                 |                                                       | 7344                                 | 83.3                   |
| HNO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  | <i>Olea europaea</i>                                  | 126                                  | 45                     |
|                                                 |                                                       | 167                                  | 59                     |
|                                                 | Sewage sludge                                         | 5927                                 | 67.2                   |
|                                                 |                                                       | 6708                                 | 76.1                   |

§) *Olea europaea* Blatter BCR (Community Bureau of Reference) No. 62

\$) Sewage sludge BCR Nr. 145

\*) Der Aufschluß war ungeeignet, da das Oxidationsmittel bereits nach wenigen Minuten verbraucht war.

#### 4.4.3. Wiederfindung von Quecksilber im biologischen Testsystem *Escherichia coli* und Standardmedium

Tabelle 4.5. zeigt die Ergebnisse von Analysenversuchen in einer Suspension von *Escherichia coli* und entsprechenden Kontrollansätzen bezüglich der Wiederfindung von Hg bei einer nominalen Konzentration von 73.9 µg Hg/l. Unter den verwendeten vier Aufschlußtechniken zeigte der Permanganat-Aufschluß in diesem System die höchsten Wiederfindungsraten in direkten Vergleich mit frisch hergestellten Standards und wurde aus diesem Grunde und aufgrund der enormen Praktikabilität als

Routinemethode ausgewählt. Innerhalb von Versuchsreihen wurden Standards immer mit den Proben gleichbehandelt, d.h. Standards und Reagenzienblindwerte wurden wie die Proben dem Aufschlußverfahren unterzogen.

**Tabelle 4.5.: Wiederfindung von Hg mit den vier Aufschlußmethoden in wässrigen Testlösungen.** Nominalkonzentration war 72 µg Hg-11/l. Daten wurden für Bidest-Wasser, steriles Standard-Vorkulturmedium und Standard-Vorkulturmedium mit *Escherichia coli* (ca. 150 mg Biotrockenmasse/l, exponentielle Wachstumsphase) erhoben.

Die Ansätze, sowie Hg-freie Kontrollen wurden vor dem Aufschluß 30 Minuten bei 303 K unter Inkubationsbedingungen in einer Ganzglasapparatur gehalten.

| Aufschluß                                       | Wiederfindung in Prozent gegen Standardwerte |                 |                   |
|-------------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------|-------------------|
|                                                 | Bidest                                       | Vorkulturmedium | E.coli Suspension |
| KMnO <sub>4</sub>                               | 95.7                                         | 97.5            | 88.0              |
|                                                 | 98.3                                         | 97.9            | 86.1              |
| HNO <sub>3</sub>                                | 85.7                                         | 91.4            | 78.3              |
|                                                 | 84.4                                         | 91.0            | 77.6              |
| HNO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 92.8                                         | 97.9            | 84.2              |
|                                                 | 96.8                                         | 98.8            | 82.3              |
| HNO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  | 94.7                                         | 94.9            | 82.4              |
|                                                 | 93.7                                         | 94.0            | 82.1              |

#### 4.5. Die extraktive spektrophotometrische Analyse der Phenole

Die extraktive Bestimmung der Phenole erschien aufgrund des geringen apparativen Aufwandes interessant für die Überwachung von Teststoffkonzentrationen. Wiederfindungsversuche mit Standardlösungen ergaben aber nur für 2-Nitrophenol und für PCP eine effektive Aufkonzentrierung mit Wiederfindungsraten bei 100%, wohingegen für 4-Nitrophenol und Phenol die extraktiven Ausbeuten bei 20% bis 30% für analytische Zwecke nicht ausreichend waren. Eine Zusammenstellung der Daten findet sich in Tabelle 4.6., wobei die Nachweisgrenzen unter der Annahme einer apparativen Signifikanzgrenze von 0.01 Extinktionseinheiten (p=99%) angegeben wurden.

**Tabelle 4.6.: Wiederfindung und Nachweisgrenzen der spektrophotometrischen Phenol-Bestimmung.**

| Substanz              | Extinktions- <sup>§</sup><br>Koeffizient<br>$\text{mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$ | Extraktions- <sup>§</sup><br>ausbeute<br>Prozent | Korrelations- <sup>#</sup><br>Koeffizient | Nachweis-<br>grenze<br>$\mu\text{Mol l}^{-1} *$ |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Phenol                | 257 (285nm)                                                                   | 34.9                                             | 0.9978                                    | 11                                              |
| 4-Nitro-<br>phenol    | 1839 (399nm)                                                                  | 20.7                                             | 0.9996                                    | 2.6                                             |
| 2-Nitro-<br>phenol    | 460 (416nm)                                                                   | 103.3                                            | 0.9997                                    | 2.1                                             |
| Pentachlor-<br>phenol | 526 (320nm)                                                                   | 109.1                                            | 0.99988                                   | 1.7                                             |

- § Die Extinktionskoeffizienten wurden aus Messungen an Standardlösungen in 0.1 Mol NaOH/l errechnet. Die Wellenlänge gibt das gemessene Absorptionsmaximum für das Phenolat-Anion an.
- § Die Ausbeuten gelten für die Extraktion aus 25 ml wässriger Phase in 5 ml Chloroform sowie Rückextraktion aus Chloroform in 0.1 Mol NaOH/l im Verhältnis 1:1 (Beispiel: Eine Aufkonzentrierung um den Faktor 5 ergibt eine Ausbeute von 100%)
- # Die Korrelationskoeffizienten gelten für die rückextrahierten Standardreihen, die bei 100% Ausbeute einen Extinktionsbereich von E=0 bis E=0.700 nicht überschreiten.
- \* Die Nachweisgrenze gilt für die angegebenen Wiederfindungen bezogen auf die Konzentration in der wässrigen Phase und 0.01 E.

Die Analysendaten wurden unter Mitarbeit von Frau S. Hesselmann gewonnen

## 5. Experimentelle Befunde an den mikrobiellen Testsystemen

Im folgenden Kapitel werden Ergebnisse der experimentellen Studien zum Kernthema dieser Arbeit dargestellt. Ausgehend von den Testorganismen und den Teststoffen werden zunächst Daten präsentiert, die zum Verständniss der Testsysteme oder für die Interpretation von Ergebnissen als Hilfsdaten notwendig sind, daran anschliessend werden die Ergebnisse zum Verbleib der Modellchemikalien in den verschiedenen Testsystemen sowie Ergebnisse aus den Toxizitätsvortests und daraus ableitbaren kinetischen Informationen dargestellt.

Als zweiter Experimentalblock treten die Ergebnisse aus der Biokalorimetrie an den verschiedenen Modellsystemen mit den zugehörigen Analysendaten hervor, die aufgrund der Fülle des Datenmaterials zum Teil sehr komprimiert präsentiert werden müssen.

Im Rahmen des sechsten Kapitels schließlich werden die Konzepte für die Interpretation der kalorimetrisch und analytisch erhaltenen Daten erarbeitet, auf deren Grundlage die Differenzierungsfähigkeit der vorgeschlagenen Konzepte für die Toxizitätsbewertung, diskutiert werden soll. Einige mechanistische Überlegungen unter Berücksichtigung des Zellaufbaues der Testorganismen und die Einreihung der Befunde bezüglich der Literaturlage schließen die Arbeit ab.

### 5.1. Teststoffe und mikrobielles Testsystem.

#### 5.1.1. Maximale spezifische Wachstumsrate der Modellorganismen

Die maximale spezifische Wachstumsrate eines Bakteriums unter gegebenen Bedingungen, wie Mediumzusammensetzung oder Temperatur, begrenzt den Arbeitsbereich einer Chemostatkultur auf Dilution-Raten unterhalb eben dieses kritischen Wertes, wenn man den Monod-Formalismus als Grundlage der weiteren Betrachtungen akzeptiert (Gl.5.1.). Die Massenbilanz des Chemostaten (Gl.5.2.) ergibt nur für Dilution-Raten unterhalb oder gleich  $\mu_c$  keine negative Änderung der Biomassekonzentration.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad (Gl.5.1.)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - DX \quad (\text{Gl. 5.2.})$$

$$\frac{dX}{dt} = X \left[ \mu_{\max} \frac{[S]}{K_S + [S]} - D \right] \quad (\text{Gl. 5.3.})$$

Betrachten wir den Gleichgewichtszustand aus der Sicht der Substratkonzentration, so erhalten wir durch Einsetzen Gl. 5.3. die für  $dX/dt=0$  genau eine Lösung in  $[S]$  besitzt, da Gl. 5.1. monoton steigt. Die Verhältnisse können sich ändern, wenn toxische Substrate eine Optimumkurve für  $\mu$  ergeben (Haldane-Formalismus); dann existieren zwei Lösungen, von denen die zweite instabil ist (Pirt, 1975). Eine eingehende Herleitung der Chemostat-Theorie findet sich bei Monod (1949) oder Herbert et al (1956).

Da eine enge Beziehung zwischen der Temperatur und der maximalen Wachstumsrate besteht (Chistyakova et al, 1983; Chohji et al, 1983; Itoh und Takahashi, 1984) wurde eine Aufnahme der spezifischen Wachstumsrate über einen physiologisch sinnvollen Temperaturbereich im Batch-Kulturverfahren mit photometrischer Bestimmung der Biomassenkonzentration ausgeführt, wobei die Auftragung der spezifischen Wachstumsrate als Arrhenius-Plot in Abb. 5.1. den Gewohnheiten der Chemie entgegenkommt. Die Arbeitstemperatur in allen weiteren Versuchen lag bei 303 K und somit im Temperaturmaximum für *Acinetobacter* und geringfügig unterhalb für *Escherichia coli*. Die spezifischen Wachstumsraten für diese Temperatur waren 0.633/h für *Escherichia coli* auf Glucose-Vorkulturmedium, 0.25/h für *Escherichia coli* auf Acetat-Vorkulturmedium und 0.725/h für *Acinetobacter* auf Acetat-Vorkulturmedium. Acetat als einzige Kohlenstoffquelle schien für *Escherichia coli* kein sehr effektives Kohlenstoffsubstrat zu sein.

In der Chemostat-Kultur können hiervon abweichende Werte auftreten (Molin, 1983; Esener et al, 1981), die auf Artefakten (Wandwachstum) oder Selektion besonders angepaßter Formen beruhen können. Eigene Versuche nach dem Auswaschverfahren ergaben ein  $\mu_{\max}$  von 0.84/h in der Chemostatkultur für *Escherichia coli* (Weppen, 1984a).

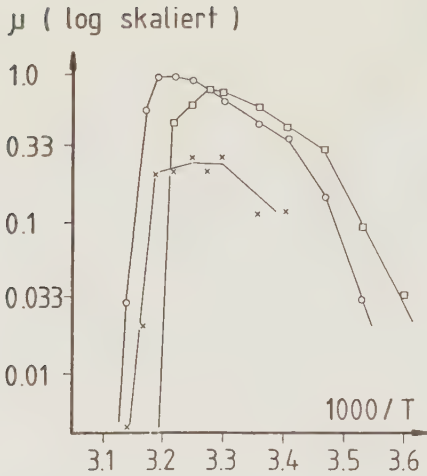


Abbildung 5.1.: Arrhenius-Plot der spezifischen Wachstumsraten von *Escherichia coli* und *Acinetobacter calcoaceticus* auf synthetischem Medium.  $\circ$  *Escherichia coli* mit 5.5 mMol Glucose/l;  $\times$  *Escherichia coli* mit 12 mMol Acetat/l;  $\square$  *Acinetobacter* mit 12 mMol Acetat/l als Kohlenstoffquelle.

#### 5.1.2. Massenbezogene Kenndaten der Testorganismen

Bilanzierungen kalorimetrischer Untersuchungsergebnisse sollen in Einheiten von Joule oder von Wärmeströmen angegeben werden, wozu eine genaue Kenntnis der Brennwerte der Biomasse notwendig ist. Prochazka et al (1970) geben einen mittleren Brennwert von 22.54 KJ/g aschefreie Biotrockenmasse für verschiedene Bakterien und Hefen an. Die Standardabweichung über 21 verschiedene Objekte beträgt jedoch  $\pm 1.41$  KJ/g, was mich zu einer Bestimmung dieser Werte unter den spezifischen Bedingungen dieser Arbeit veranlaßte. Die Brennwertbestimmungen wurden mit einem adiabatischen Bombenkalorimeter ausgeführt, Resultate der Messungen finden sich in Tabelle 5.1., die auch die Aschegehalte der verschiedenen Materialien sowie den Anteil der Biotrockenmasse im Zellfrischgewicht enthält. Die gefundenen Brennwerte für aschefreie *Escherichia coli* und *Acinetobacter* Biotrockenmasse liegen etwas über den Literaturwerten, jedoch noch innerhalb ihrer Standardabweichung.

| Organismus/<br>Material            | BTM <sup>§)</sup><br>Frischmasse<br>[ % ] | Aschegehalt<br>BTM<br>[ % ] | Brennwert <sup>&amp;)</sup><br>BTM<br>[ J/g ] | Brennwert <sup>€)</sup><br>VBTM<br>[ J/g ] |
|------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i>            | 18.5<br>± 1.3                             | 9.24<br>± 0.43              | 21604<br>± 10                                 | 23557                                      |
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | 20.9<br>± 1.15                            | 14.9                        | 21063<br>± 48                                 | 24200                                      |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>    |                                           | 5.97\$)<br>± 0.23           | 19006\$§#)<br>± 353                           | 20213                                      |
| Belebtschlamm<br>Metjendorf        |                                           | 26.2#)<br>± 0.08            | 16628\$#)<br>± 434                            | 22531                                      |

\$ Hesselmann und Weppen (1985, unpubl.)

§ Klein und Weppen (1985, unpubl.)

# Voss, Struck, Koke und Weppen (1985, unpubl.)

§/€ BTM=Biotrockenmasse; VBTM=Aschefreie Biotrockenmasse

& Die Reproduzierbarkeit von Kalibrierungsversuchen am Verbrennungskalorimeter lag bei 0.15% (J. Miegitz und P. Weppen) der Richtigkeitsfehler beträgt etwa 0.5%.

**Tabelle 5.1.: Brennwerte und Massenrelationen für die Modellorganismen *Escherichia coli*, *Acinetobacter calco-aceticus* und andere biologische Materialien.**

### 5.1.3. Verteilungskoeffizienten der organischen Modellsbstanzien unter experimentellen Bedingungen

Verteilungskoeffizienten von organischen Substanzen für Modellsysteme wie n-Octanol/Wasser (Bowman und Sans, 1983) oder andere (Butte et al, 1982) werden als wichtiges Hilfsmittel zur Einschätzung der biologischen Wirksamkeit einer Substanz angesehen (s.o.). Dieser Verteilungskoeffizient wird für saure oder basische organische Komponenten zumeist für die undissoziierte Form, d.h. oft bei unphysiologischen pH-Werten bestimmt (Butte et al, 1982) oder aber durch Verteilung zwischen Bidest-Wasser und der organischen Phase (Bowman und Sans, 1983). Unter physiologischen Bedingungen können die sauren oder basischen Komponenten jedoch mehr oder weniger stark dissoziiert vorliegen, abhängig vom aktuellen pH-Wert und dem  $pK_s$  oder  $pK_b$  der Komponenten. Entsprechende Betrachtungen zur

tatsächlichen Verfügbarkeit der chemischen Spezies dürfen bei der substanzbezogenen Bewertung von Ergebnissen nicht außer Acht gelassen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden empirische Daten zu Verteilungskoeffizienten unter physiologischen Randbedingungen ermittelt, indem gepufferte wässrige Lösungen der Komponenten ( $100 \mu\text{Mol/l}$ ) mit n-Hexan ins Gleichgewicht gebracht wurden und anschließend die Konzentrationsverhältnisse spektrophotometrisch für die organische und wässrige Phase bestimmt wurden. Als wässrige Pufferlösungen dienten Citrat-Puffer für pH 5 bis pH 6; Orthophosphat-Puffer pH 6.5 bis 7.5 und Na-Tetraborat-Puffer pH 8 bis 9 jeweils in der Konzentration von  $73 \text{ mMol/l}$ . Der pH-Wert wurde mit NaOH beziehungsweise HCl eingestellt. Die Resultate sind in Abbildung 5.2. für den Arbeitsbereich pH 5 bis pH 9 dargestellt. Die photometrischen Messungen erfolgten nach Phasentrennung und Einstellung der wässrigen Phase auf einen pH oberhalb von 12 oder nach Extraktion der organischen Phase mit  $0.1 \text{ Mol NaOH/l}$  (nur bei den Phenolen) im Absorptionsmaximum der Komponente gegen gleichbehandelte Standardproben und Blindwerte.

Tabelle 5.2. gibt einen knappen Überblick über die Substanz-Kenndaten, wie  $\text{pK}_s$ -Werte, Verteilungskoeffizienten der undissoziierten Form, den hier gemessenen n-Hexan-Puffer Koeffizienten für neutralen pH-Wert, sowie den Anteil undissoziierter Teststoffmoleküle berechnet nach der Henderson-Hasselbalch-Gleichung (in Saarikoski et al, 1986).

Die Diskussion über die Bedeutung dieser physikalisch-chemischen Parameter soll in Kap. 6 vor dem Hintergrund der speziellen Zytotoxikologie der Gram-negativen Bakterien folgen, wenn die Daten aus Toxizitätsbewertungen vorliegen.

**Tabelle 5.2.: Verteilungskoeffizienten,  $pK_s$ -Werte, anteilige Konzentrationen der Phenolat-Anionen, beziehungsweise Anilid-Kationen bei einem physiologischen pH-Wert von 7.0 sowie empirisch ermittelte Verteilungskoeffizienten zwischen n-Hexan und wässriger Pufferlösung (eigene Meßdaten).**

| Komponente                                                                                                                                                                                                                                                                   | $pK_s$ <sup>\$</sup> | $\log(K_{OW})$ <sup>\$</sup> |                     | $\log(K_{HP})$ | relative Konz. <sup>#</sup><br>dissoziiert |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------|---------------------|----------------|--------------------------------------------|
| Phenol                                                                                                                                                                                                                                                                       | 9.81 <sup>(1)</sup>  | 1.47 <sup>(6)</sup>          | 1.46 <sup>(4)</sup> | -1.11          | 0.00134                                    |
| Pentachlor-phenol                                                                                                                                                                                                                                                            | 4.71 <sup>(4)</sup>  | 5.01 <sup>(6)</sup>          | 5.15 <sup>(4)</sup> | 0.57           | 0.99490                                    |
| 2-Nitrophenol                                                                                                                                                                                                                                                                | 7.17 <sup>(1)</sup>  | 1.76 <sup>(6)</sup>          | 2.91 <sup>(5)</sup> | 1.14           | 0.403                                      |
| 4-Nitrophenol                                                                                                                                                                                                                                                                | 7.15 <sup>(1)</sup>  | 1.91 <sup>(6)</sup>          |                     | <-2            | 0.414                                      |
| 2,4-Dinitrophenol                                                                                                                                                                                                                                                            | 3.96 <sup>(2)</sup>  |                              |                     | <-2            | 0.99909                                    |
| 2,6-Dimethylphenol                                                                                                                                                                                                                                                           |                      |                              |                     | 1.0            |                                            |
| Anilin                                                                                                                                                                                                                                                                       | 4.63 <sup>(1)</sup>  |                              |                     | 0.04           | 0.00425                                    |
| 4-Cl-Anilin                                                                                                                                                                                                                                                                  | 4.15 <sup>(1)</sup>  |                              |                     | 0.59           | 0.00148                                    |
| 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure                                                                                                                                                                                                                                                 |                      | 2.81 <sup>(3)</sup>          |                     | <-2            |                                            |
| <p>§ Im Falle der Anilin-Derivate ist der Wert 14-<math>pK_b</math> angegeben</p> <p>\$ Literaturdaten für n-Octanol/Wasser Verteilungskoeffizienten</p> <p># die Daten wurden nach den Gleichungen für Pufferlösungen in Christen (1973) für einen pH von 7.0 errechnet</p> |                      |                              |                     |                |                                            |

- 1) Handbook of Chemistry and Physics, Vol. 55 (1977), D-129 f.; R.C. Weast (Ed); CRC Press, Cleveland Ohio
- 2) Riedel de Haen, Firmenschrift o.J. 'Säure-Base Titrationen in nicht wässrigen Lösungen'
- 3) Mackay, Bobra & Shiu (1980)
- 4) Saarikoski et al (1986)
- 5) Mackay (1982)
- 6) Butte et al (1982)

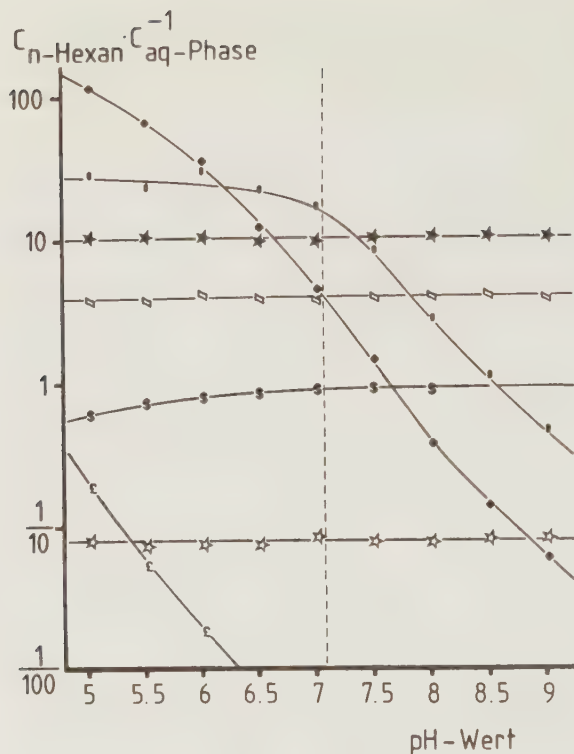


Abbildung 5.2.:

Verteilungskoeffizienten der Modellchemikalien im System wässrige Pufferlösung / n-Hexan.

● 2-Nitrophenol; ★ 2,6-Dimethylphenol; ◆ Pentachlorophenol; □ 4-Chloranilin; \$ Anilin; ✕ Phenol; ε 2,4-Dinitrophenol.

Die Verteilungskoeffizienten von 4-Nitrophenol und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure lagen unterhalb von 0.01 im gesamten vermessenen pH-Bereich.

#### 5.1.4 Verbleib der Testchemikalien unter Experimentalbedingungen

Die Bedeutung eines sorgfältigen Monitorings von Teststoffkonzentrationen in biologischen Wirkungstests wurde bereits begründet, zur Absicherung wurden deshalb einige In-Vitro Versuche angestellt, die die Frage der Flüchtigkeit der Substanz über eine experimentell bedeutsame Zeitspanne von etwa 1h klären sollten. Im einfachsten Fall wurde steriles Vorkultur-

medium unter Standardbedingungen mit dem Teststoff versetzt und die Konzentration über den Zeitverlauf gemessen. Zur Inkubation diente eine Glasapparatur mit einem Durchmesser und einer Belüftung, die der kalorimetrischen Meßzelle entsprach. Die Verflüchtigungsversuche sind in Abbildung 5.3. für die kalorimetrisch bearbeiteten Stoffe dargestellt. 2-Nitrophenol war unter diesen Bedingungen als einzige Komponente mit einer Verlustrate von ca. 20%/h deutlich flüchtig. Für Pentachlorphenol ergab sich nur bei niedriger Konzentration eine sehr geringe Verlustrate, was mit dem überwiegenden Vorliegen des Phenolat-Anions bei pH 7.1 zu erklären ist. Phenol zeigte bei hoher und niedriger Testkonzentration ebenfalls keine bedeutsamen Konzentrationsverluste.

In Gegenwart von *Escherichia coli* Zellen zeigte sich für 2-Nitrophenol und Pentachlorphenol das gleiche Resultat, Phenol wurde nicht getestet. Für die experimentellen Arbeiten wurde aus diesen Ergebnissen der Schluß gezogen, daß die Substanzen Phenol und Pentachlorphenol im kalorimetrischen System weder abiotische noch biotische Konzentrationsänderungen erfahren, während bei 2-Nitrophenol mit größeren Abweichungen zwischen Nominalkonzentration und tatsächlicher Konzentration zu rechnen war.

Grundsätzlich abweichend verhielt sich das Quecksilber-II-Chlorid. Ausgehend von Wiederfindungsversuchen nach Dosierungen am Chemostatsystem, bei denen lediglich 20% bis 40% Wiederfindung zu erreichen waren, wurde nach einer möglichen Ursache gesucht. In Ganzglas-Apparaturen wurde durchweg eine hohe Wiederfindung erreicht, wie die Daten zur Methodensicherung in Kap. 4 belegen, so daß eine mögliche Ursache in den Kalorimeter-Werkstoffen gesucht wurde, von denen die Edelstahlteile besonders bedeutsam schienen.

Eine Probeinkubation von sterilem Standard-Vorkulturmedium mit 720 µg Hg/l zusammen mit einem Edelstahlteil des Kalorimetersystems ergab eine rasche Abnahme der Hg-Konzentration um 60% innerhalb von 30 Minuten. Da die Teststoffe im kalorimetrischen Testverfahren zwangsläufig mit Edelstahlteilen in Kontakt treten (Injektorblock, Meßzellen) mußte mit erheblichen systematischen Fehlern gerechnet werden, so daß kalorimetrische Untersuchungen zur Quecksilber-Toxizität nur qualitativ bewertet werden sollten. Vergleichbare Probleme werden von anderen Autoren (Mayfield et al, 1980) bei Arbeiten mit Standard-Fermentern nicht genannt, obwohl derartige Geräte zumeist größere Einbauten aus Edelstahl enthalten. Möglicherweise wurde die Problematik aufgrund der fehlenden Kontrollanalytik auch übersehen.

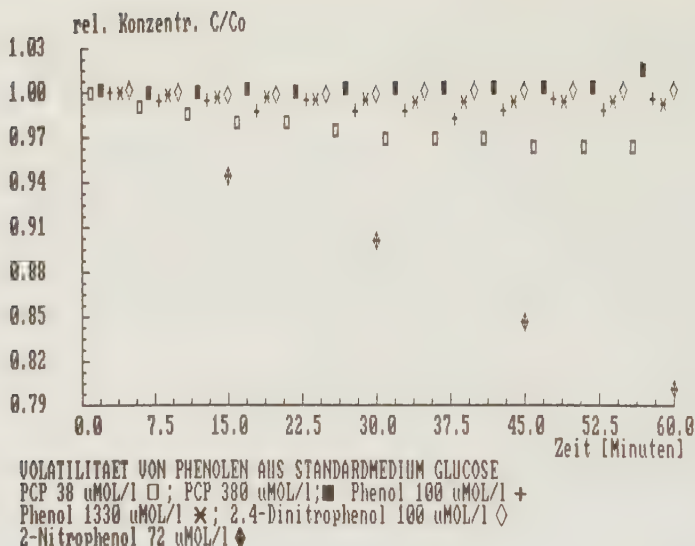


Abbildung 5.3.: Das Verhalten der Teststoffe PCP, Phenol und 2-Nitrophenol in sterilem, belüftetem Chemostat-Kulturmedium für *Escherichia coli*. Die Versuchsbedingungen entsprachen sehr genau den Bedingungen in der Kalorimeter-Meßzelle.

## 5.2. Toxikologische Untersuchungen im Batch-Verfahren

Die Tabellendaten aus Kap. 2 zur Toxizität der Modellchemikalien belegen m.E. eindrucksvoll, mit welcher Spannweite von Ergebnissen bei toxikologischen Untersuchungen gerechnet werden muß. Um dennoch unter den Randbedingungen meiner Experimentalarbeiten in sich vergleichbare Toxizitätsschätzwerte zu erhalten, wurden eine Reihe von Batch-Toxizitätstests ausgeführt und mit mehr oder weniger anerkannten Verfahren bewertet.

Als einfachste Verfahren stehen graphische Bewertungsmethoden zur Verfügung, wie sie von Bringmann und Kühn (1977) verwendet werden oder verschiedentlich in der Literatur auftauchen. Der Nachteil dieser Methoden ist ihr geringer Automatisierungsgrad, so daß hier ein Rechenverfahren verwendet wurde, das die manuelle Interpretation ersetzt, dem Benutzer aber durch die graphische Kontrolle der Ergebnisse jederzeit einen Eingriff erlaubte. Die notwendigen Rechenverfahren standen als Bestandteil des Software-Paketes MEN zu Verfügung.

Konzentrations-Wirkungskurven zeigten in meinen Versuchen im linearen Maßstab durchweg starke Nichtlinearitäten, so daß auf eine Anpassung der Konzentrationsachse durch logarithmische Transformation nicht verzichtet werden konnte, aber auch das Modell einer logarithmischen Konzentrationsskalierung gegen eine lineare Response-Skala (Grad der Hemmung) erbrachte oft keine Linearität und die Anpassung mit der Probit-Transformation, die aus der pharmakologischen Tierversuchspraxis stammt (Chan et al, 1984), war ebenfalls nicht grundsätzlich anwendbar.

Davon völlig unabhängig besteht die Frage nach der grundsätzlichen Anwendbarkeit statistischer Bewertungsverfahren, wie der Probit-Analyse, die auf Datenmaterialien mit alternativen Zuständen von z.B. Testtieren in einem entsprechenden experimentellen Design, zugeschnitten sind, gegenüber quantitativen Messwerten, wie Sauerstoffzehrungsraten oder spezifischen Wachstumsraten. Insbesondere die Ermittlung von Vertrauensbereichen muß hier als Problem gesehen werden.

Im Rahmen der Bewertung von Toxizitätsscreening-Tests stellte sich heraus, daß zwischen den rechnergestützt ermittelten IC 50 Daten und den graphisch ermittelten Werten einerseits und zwischen den Ergebnissen aus der Anpassung mit der LOG-LIN-Transformation und der LOG-PROBIT-Transformation andererseits gute Übereinstimmung bestand. Die LOG-PROBIT-Transformation wurde nach einem FORTRAN Programm von Davies (1971) realisiert, das verschiedene Näherungsverfahren und eine iterative MOST-LIKELYHOOD-SCHÄTZUNG der Parameter enthält. Die Angabe von Vertrauensbereichen erfolgte für die LOG-LIN-Anpassung mit Hilfe der Standardabweichung der linearen-Regressionsanalyse (Programmteil nach Müller und Kick, 1983). In der Probit-Analyse diente die dort berechnete Varianz des IC-50 Schätzwertes zur Ermittlung der Vertrauensbereiche. Als wichtige Randbedingung mußten die Daten den IC-50 Bereich zu beiden Seiten mit etwa gleicher Punktedichte überdecken, wenn dies nicht der Fall war, enthält die Ergebnistabelle eine Anmerkung. Die Daten über die Steigung der Anpassungsgeraden können nach Chan et al (1984) wichtige Hinweise auf den Wirkmechanismus geben und wurden aus diesem Grunde von mir mit in die Tabellen genommen. Eine Bewertung der Ergebnisse soll aber Kap. 6 vorbehalten bleiben. Die Auswertungsmethodik für Toxizitätstests zum mikrobiellen Wachstum und zur Sauerstoffzehrungsrate unterschied sich nicht.

### 5.2.1. Toxizität gegenüber dem mikrobiellen Wachstum

Atmungsaktivität und Wachstum müssen nicht zwingend miteinander korreliert sein, wenngleich eine derartige Korrelation unter normalen Lebensbedingungen beobachtbar ist (Fenchel und Finlay, 1983; May, 1980). Als weiterer wesentlicher Unterschied gegenüber dem respirometrischen Testverfahren kann die Messdauer über mehrere Generationszeiten angesehen werden, so daß es gerechtfertigt erschien, beide Teststrategien zu verfolgen. Die Ausgangsbedingungen wurden mit einer Zellkonzentration von 15 mg/l beziehungsweise 12 mg/l für *Escherichia coli* und *Acinetobacter calcoaceticus* etwas niedriger gewählt, als im Respirationstest. Messergebnisse mußten vor der toxikologischen Bewertung zunächst mit den aus der Mikrobiologie bekannten Verfahren, wie Logarithmieren der Zellkonzentrationsdaten und lineare Regression (Esener et al, 1981), in spezifische Wachstumsraten umgerechnet werden. Ergebnisse sind in Tabelle 5.3. zusammengestellt. Bedingt durch die simultane Ausführung von bis zu 12 Testansätzen wurde eine sehr hohe Reproduzierbarkeit innerhalb einzelner Testansätze von 2,3% für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P_i=0.01$  ( $n=9$ ) erreicht, was diesen Test sicherlich als eine mögliche Routine-Technik qualifiziert.

### 5.2.2. Respirometrische Toxizitätsbestimmung

Respirationsdaten wurden standardisiert bei 303 K in Vorkulturmedium ermittelt, wobei eine Zellkonzentration von 30 mg Biotrockenmasse pro Liter für *Escherichia coli* und von 24 mg/l für *Acinetobacter* (Optische Dichte 0,100 bei 578 nm) eingesetzt wurde. Bedingt durch die sequentielle Ausführung der Tests ergab sich eine geringfügige Aktivitätsabnahme der Bakteriensuspension über die Messdauer, die durch das randomisierte experimentelle Design in einen zufälligen Fehler überführt wurde, verbunden mit einem notwendigerweise größeren Vertrauensbereich von etwa 7% für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P_i=0.05$ . Mit Ausnahme von Quecksilber-II-Chlorid erfolgte die Aufzeichnung der Sauerstoffzehrung direkt vom Moment der Zugabe des Stoffes an. Resultate sind in Tabelle 5.4. zusammengestellt.

**Tabelle 5.3.: Toxische Wirkung der Modellsubstanzen auf das Wachstum der Bakterien *Acinetobacter calcoaceticus* und *Escherichia coli*. IC-50 Daten nach Anpassung der Meßwerte mit dem LOG-LIN-Modell und der LOG-Probit Transformation.**

| Substanz                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | IC-50                    | Vertrauensbereich  | Steigung <sup>§</sup> | Modell |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------|-----------------------|--------|
| <b><i>Escherichia coli</i></b>                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                          |                    |                       |        |
| Quecksilber<br>(als Hg-II)                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 26 µg/l                  | 25 - 27 µg/l       | 1.33                  | A      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 26 µg/l                  | 24 - 27 µg/l       | 3.71                  | B      |
| Phenol                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 4770 µMol/l              | 4600 - 4950 µMol/l | 1.42                  | A      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 4950 µMol/l              | 4650 - 5270 µMol/l | 3.75                  | B      |
| Pentachlor-<br>phenol                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 255 µMol/l               | 240 - 270 µMol/l   | 1.81                  | A      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 250 µMol/l               | 240 - 259 µMol/l   | 5.49                  | B      |
| 2-Nitrophenol                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 294 µMol/l               | 280 - 310 µMol/l   | 0.96                  | A      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 296 µMol/l               | 251 - 345 µMol/l   | 2.55                  | B      |
| <b><i>Acinetobacter calcoaceticus</i></b>                                                                                                                                                                                                                                                                            |                          |                    |                       |        |
| Quecksilber<br>(als Hg-II)                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 115 µg/l <sup>§</sup>    | _____              | _____                 |        |
| Phenol                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 7000 µMol/l <sup>§</sup> | _____              | _____                 |        |
| Pentachlorph.                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 12 µMol/l <sup>§</sup>   | _____              | _____                 |        |
| 2-Nitrophenol                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 78 µMol/l                | 74.7 - 80.5 µMol/l | 1.47                  | A      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 78 µMol/l                | 74.0 - 82.0 µMol/l | 4.23                  | B      |
| <p>A) Modellanpassung mit logarithmischer Konzentrationsskala und linearer Responseskala.</p> <p>B) Anpassung mit der LOG-PROBIT-Transformation</p> <p>§) Die Steigung gilt für die Anpassungsgerade des jeweiligen Modelles im Bereich der IC-50 Konzentration.</p> <p>§) Daten aus Weppen und Schuller (1984a)</p> |                          |                    |                       |        |

**Tabelle 5.4A: Toxizität der Modellsubstanzen im Respirometer-Testverfahren unter standardisierten Bedingungen für *Escherichia coli* (vgl. Text).**

| Substanz                                                                                                  | IC-50                   | Vertrauensbereich              | Steigung <sup>§</sup> | Modell |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------|-----------------------|--------|
| 2-Nitrophenol                                                                                             | 650 µMol/l              | 604 - 697 µMol/l               | 0.33                  | A      |
|                                                                                                           | 646 µMol/l              | 215 - 1930 µMol/l              | 0.879                 | B      |
| 4-Nitrophenol                                                                                             | 860 µMol/l              | 776 - 963 µMol/l               | 2.57                  | A      |
|                                                                                                           | 905 µMol/l              | 897 - 920 µMol/l               | 6.76                  | B      |
| 2,4-Dinitrophenol                                                                                         | 2390 µMol/l             | 2040 - 2620 µMol/l             | 0.39                  | A      |
|                                                                                                           | 1990 µMol/l             | 230 - 17000 µMol/l             | 1.19                  | B      |
| Phenol                                                                                                    | 7000 µMol/l             | 6870 - 7080 µMol/l             | 0.56                  | A      |
|                                                                                                           | 13500 µMol/l            | 90 - 170000 µMol/l             | 3.75                  | B      |
| Pentachlorphenol                                                                                          | 334 µMol/l              | 319 - 349 µMol/l               | 1.65                  | A      |
|                                                                                                           | keine Anpassung möglich |                                |                       | B      |
| 2,6-Dimethylphenol                                                                                        | 4720 µMol/l             | 3820 - 5810 µMol/l             | 1.46                  | A      |
|                                                                                                           | 4790 µMol/l             | 4610 - 4980 µMol/l             | 4.62                  | B      |
| Anilin                                                                                                    | 9600 µMol/l             | 8300 - 11000 µMol/l            | 1.61                  | A      |
|                                                                                                           | keine Anpassung möglich |                                |                       | B      |
| 4-Chloranilin                                                                                             | 4800 µMol/l             | 4380 - 5400 µMol/l             | 2.20                  | A      |
|                                                                                                           | 4940 µMol/l             | 4800 - 5060 µMol/l             | 6.28                  | B      |
| 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure                                                                              | >1800 µMol/l            | (Daten überdecken nicht IC-50) |                       |        |
| Dimethylsulfoxid                                                                                          | >130000 µMol/l          | (Daten überdecken nicht IC-50) |                       |        |
| Quecksilber-II-chlorid (als Hg)                                                                           | 246 µg/l                | 191 - 320 µg/l                 | 2.37                  | A      |
|                                                                                                           | 246 µg/l                | 238 - 256 µg/l                 | 4.86                  | B      |
| A) Modellanpassung mit logarithmischer Konzentrationsskala und linearer Responseskala.                    |                         |                                |                       |        |
| B) Anpassung mit der LOG-PROBIT-Transformation                                                            |                         |                                |                       |        |
| §) Die Steigung gilt für die Anpassungsgerade des jeweiligen Modelles im Bereich der IC-50 Konzentration. |                         |                                |                       |        |

**Tabelle 5.4B: Toxizität der Modellsbstanzn im Respirometer-Testverfahren unter standardisierten Bedingungen für *Acinetobacter calcoaceticus* (vgl. Text).**

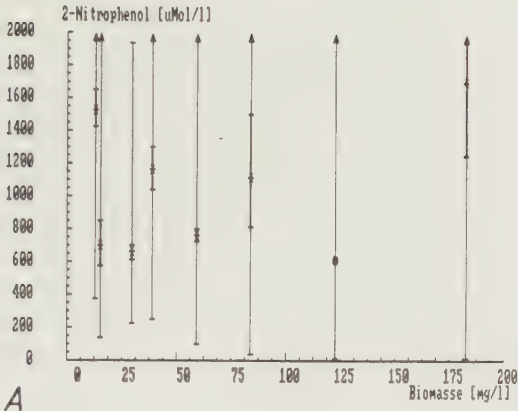
| Substanz                                                                                                  | IC-50          | Vertrauensbereich              | Steigung <sup>§</sup> | Modell |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|--------------------------------|-----------------------|--------|
| 2-Nitrophenol                                                                                             | 530 µMol/l     | 445 - 654 µMol/l               | 0.261                 | A      |
|                                                                                                           | 540 µMol/l     | 210 - 1380 µMol/l              | 0.66                  | B      |
| 4-Nitrophenol                                                                                             | 1080 µMol/l    | 990 - 1180 µMol/l              | 2.89                  | A      |
|                                                                                                           | 1160 µMol/l    | 1120 - 1200 µMol/l             | 5.62                  | B      |
| 2, 4-Dinitrophenol                                                                                        | 961 µMol/l     | 912 - 1010 µMol/l              | 0.76                  | A      |
|                                                                                                           | 1040 µMol/l    | 859 - 1245 µMol/l              | 1.93                  | B      |
| Phenol                                                                                                    | 13700 µMol/l   | 13200 - 14100 µMol/l           | 1.00                  | A      |
|                                                                                                           | 13800 µMol/l   | 12500 - 15100 µMol/l           | 2.79                  | B      |
| Pentachlorphenol                                                                                          | 18 µMol/l      | 16.9 - 19.5 µMol/l             | 0.23                  | A      |
|                                                                                                           | 15 µMol/l      | 5.6 - 43.2 µMol/l              | 0.77                  | B      |
| 2, 6-Dimethylphenol                                                                                       | 1470 µMol/l    | 1300 - 1700 µMol/l             | 1.26                  | A      |
|                                                                                                           | 1500 µMol/l    | 1200 - 1800 µMol/l             | 2.94                  | B      |
| Anilin                                                                                                    | 6650 µMol/l    | 5970 - 7420 µMol/l             | 1.74                  | A      |
|                                                                                                           | 6630 µMol/l    | 6370 - 6890 µMol/l             | 5.01                  | B      |
| 4-Chloranilin                                                                                             | 5370 µMol/l    | 5060 - 5700 µMol/l             | 0.71                  | A      |
|                                                                                                           | 5400 µMol/l    | 2990 - 9700 µMol/l             | 1.91                  | B      |
| 2, 4-Dichlorphenoxyessigsäure                                                                             | >1000 µMol/l   | (Daten überdecken nicht IC-50) |                       |        |
| Dimethylsulfoxid                                                                                          | >130000 µMol/l | (Daten überdecken nicht IC-50) |                       |        |
| Quecksilber-II-chlorid (als Hg)                                                                           | 915 µg/l       | 760 - 1100 µg/l                | 0.29                  | A      |
|                                                                                                           | 930 µg/l       | 210 - 2600 µg/l                | 0.89                  | B      |
| A) Modellanpassung mit logarithmischer Konzentrationsskala und linearer Responseskala.                    |                |                                |                       |        |
| B) Anpassung mit der LOG-PROBIT-Transformation                                                            |                |                                |                       |        |
| §) Die Steigung gilt für die Anpassungsgerade des jeweiligen Modelles im Bereich der IC-50 Konzentration. |                |                                |                       |        |

### 5.2.3. Zellkonzentrationsabhängigkeit der IC-50

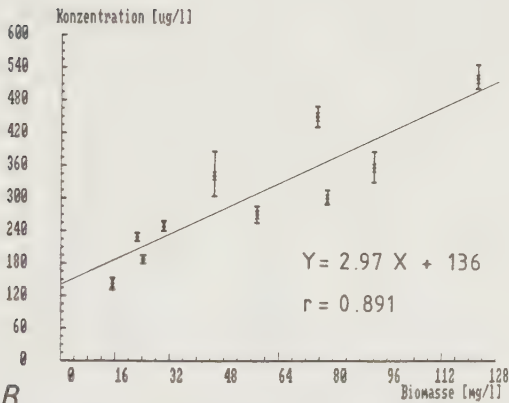
Eine mögliche Abhängigkeit der toxischen Nominalkonzentration von Chemikalien von der Organismenkonzentration kann die Übertragbarkeit von Daten aus relativ verdünnten Systemen auf organismenreiche oder umgekehrt stören, wenn derartige Effekte unentdeckt bleiben. In der Literatur wird auf dieses Problem verschiedentlich hingewiesen, insbesondere im Zusammenhang mit dem Verlust an Substanzkonzentration durch Bioakkumulation (Banerjee et al, 1984) und es wird sogar auf dieser Grundlage eine Abschätzung von Biokonzentrationsfaktoren vorgenommen (Kooijman, 1981). Respirometrische Toxizitätstests mit verschiedenen Biomassekonzentrationen, die mit den Substanzen Quecksilber-II-Chlorid, Phenol, 2-Nitrophenol und PCP an *Escherichia coli* ausgeführt wurden, ergaben jedoch nur für das Quecksilber eine deutlich erkennbare Abhängigkeit, die auch von Larson und Schaeffer (1982) für Belebtschlamm beschrieben wird. Beispielhafte Daten, die nur mit Hilfe der respirometrischen Kurzzeit-Meßtechnik an exponentiell wachsenden Bakteriensuspensionen ermittelt werden konnten, sind in Abbildung 5.4. zusammengestellt.

Die Bewertung eines linearen, korrelativen Zusammenhanges zwischen der Biotrockenmassekonzentration im Toxizitätstest und der ermittelten nominalen IC 50 Konzentration fand unter Hinzuziehung der Vertrauensbereiche sowie eines Anpassungsversuches der IC 50 Daten mittels linearer Regression statt. Für 2-Nitrophenol wurde aus den Beobachtungen geschlossen, daß nur ein statistischer Zusammenhang zwischen den beiden Parametern besteht, für Pentachlorphenol legten die engen Vertrauensbereiche und eine kaum von Null verschiedene Geradensteigung eine Unabhängigkeit der beiden Variablen nahe ( $IC\ 50 = konst$ ), was auch für Phenol gefunden wurde. Quecksilber-II ergab eine mäßig signifikante positive Korrelation zwischen IC 50 und Zellkonzentration nach einer Geradengleichung (vergl. Abb. 5.4B).

Langzeitige Messverfahren, wie der Wachstumsratenhemmtest sind auf dieses Problem aufgrund der zeitlichen Änderung der Biomassekonzentration nicht anwendbar.



A



B

Abbildung 5.4.: Besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Biomassekonzentration im respirometrischen Testverfahren und den ermittelten nominalen IC-50-Konzentrationen ?

- A) Die IC-50 Werte für 2-Nitrophenol gegenüber *Escherichia coli* mit ihren Vertrauensbereichen aus dem LOG-LIN-Modell ( $\{=X=\}$ ) und dem LOG-PROBIT-Modell ( $\{---\}$ ). Vertrauensbereiche aus der LOG-PROBIT-Anpassung erreichen extreme Obergrenzen, die vom Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve stark abweichen. Ein korrelativer Zusammenhang kann nicht angenommen werden, da i) die Vertrauensbereiche extrem groß und überlappend sind und ii) eine Anpassungsgerade durch die IC-50 eine Steigung ergab, die nicht signifikant von Null verschieden war, verbunden mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.343.
- B) Für Quecksilber-II und *Escherichia coli* kann ein korrelativer Zusammenhang angenommen werden, da i) die Vertrauensbereiche schmal und nicht überlappend waren und ii) eine Anpassungsgerade mit signifikanter Steigung und passablem Korrelationskoeffizienten von 0.891 erhalten wurde.

#### 5.2.4. Kinetik der physiologischen Reaktion auf Noxen

Messungen zur Kinetik der Sauerstoffaufnahme von Bakterien-suspensionen ergaben für die Intoxikation mit Quecksilber-II-Chlorid eine deutliche Zeitabhängigkeit, die mit der Einstellung eines Verteilungsgleichgewichtes für den Teststoff zwischen wässriger Phase und Organismen erklärt werden kann. Für die Teststoffe 2-Nitrophenol und PCP konnte eine Abhängigkeit der Wirkung von der Expositionsdauer im Gegensatz zu Arbeiten mit größeren Organismen, wie Fischen (McLeese et al, 1981) nicht beobachtet werden, was jedoch möglicherweise nur an der geringen zeitlichen Auflösung im Verhältniss zu einer raschen Gleichgewichtseinstellung lag. Die Abbildungen 5.5A bis D veranschaulichen die Methodik der respirometrischen Toxizitätsmessung mit der Möglichkeit der Kinetischen Auswertung.

---

Abbildung 5.5.: Die Kinetik der toxischen Wirkung von Penta-chlorphenol (A/B) und Quecksilber-II-Chlorid (C/D) gegenüber *Escherichia coli* im Sauerstoffzehrungs-Test.

Links die Sauerstoffkonzentration als  $f(t)$ , rechts die Zehrungsrate. Teststoffkonzentrationen für PCP: 0  $\mu\text{Mol/l}$  ( $\square$ ); 187  $\mu\text{Mol/l}$  (+); 282  $\mu\text{Mol/l}$  ( $\blacksquare$ ); 375  $\mu\text{Mol/l}$  (\*).

Konzentrationen für Quecksilber: 0  $\mu\text{g/l}$  ( $\square$ ); 100  $\mu\text{g/l}$  (+); 237  $\mu\text{g/l}$  ( $\blacksquare$ ); 412  $\mu\text{g/l}$  (O) und 750  $\mu\text{g/l}$  ( $\diamond$ ). Die Wirkung von Hg zeigte im Gegensatz zu PCP und 2-Nitrophenol eine starke zeitliche Abhängigkeit der Zehrungsrate. Die Biomassekonzentration betrug in den Versuchen etwa 42 mg Biotrockenmasse/l.

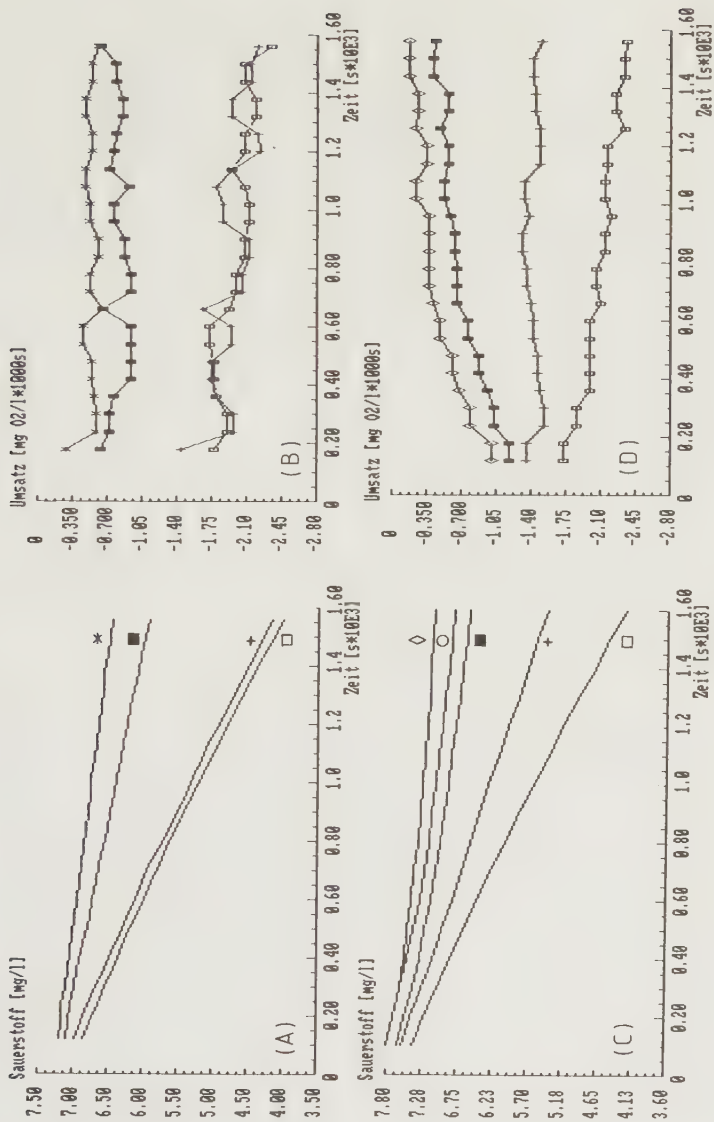


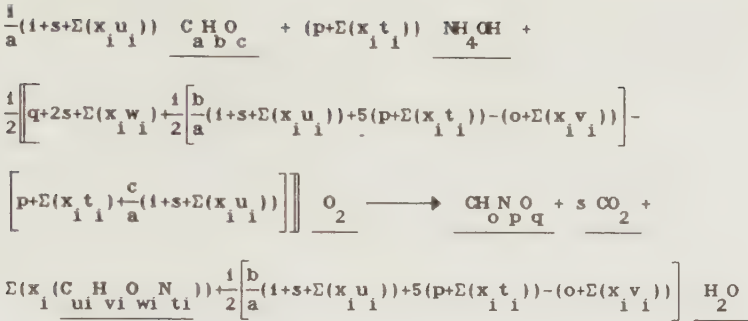
Abb. 5.5.

### 5.3. Kalorimetrische Untersuchungsergebnisse

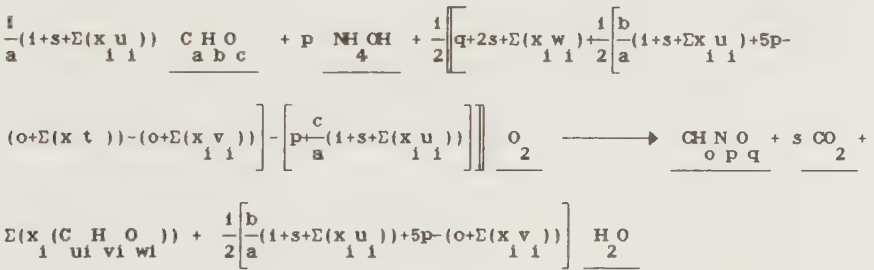
Kalorimetrische Untersuchungen und Energieflußbilanzierungen zur differenzierenden Bewertung toxischer Wirkungen von Umweltchemikalien sind ein Hauptanliegen dieser Arbeit. Die Breite des verfügbaren Datenmaterials zwingt jedoch zur gezielten Auswahl und Systematisierung der einzelnen Versuchsergebnisse, was in den folgenden Abschnitten beginnend bei den älteren Daten mit einfachen Bewertungsansätzen bis hin zur stofflichen Bilanzierung von E.coli Chemostatkulturen erfolgen soll. Zuvor sollen aber einige Grundsatzfragen zur Auswertungsmethodik erörtert werden.

Kalorimetrische Messungen an mikrobiellen Systemen stellen lediglich ein Abbild der katabolischen Reaktionen oder genauer der katabolischen Reaktionsenthalpien  $\Delta H_{cat}$  dar, sofern sie an chemoorganotrophen Mikroorganismen mit Kohlenhydraten oder anderen sauerstoffhaltigen C-Quellen als Substrat durchgeführt werden. Die anabolischen Prozesse, die zur Biosynthese führen, verlaufen mit Enthalpieänderungen nahe bei Null (Belaich, 1980), was vor wenigen Jahren zumindest aus experimenteller Sicht zum Teil noch kontrovers diskutiert wurde (Dermoun und Belaich, 1979). Gute Hinweise auf die Validität der o.g. Annahme liefert Battley (1960a, 1960b) mit thermochemischen Modellrechnungen. Eine umfassendere Behandlung findet sich auch bei Weppen (1983), so daß dieses Thema im Gegensatz zu Bilanzierungsansätzen, nicht weiter behandelt wird.

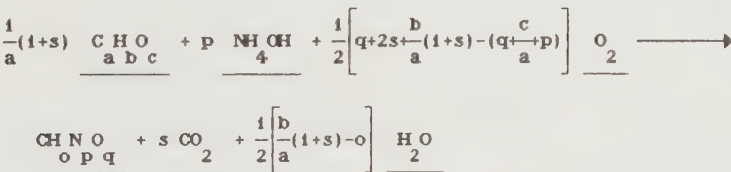
Die Bilanzierung des enthalpischen Energieflusses einer Bakterienkultur muß, grundsätzlich unabhängig von der Betrachtung einer Batch- oder Chemostatkultur, sowohl einen hinreichenden Ansatz für die Edukt- wie für die Produktseite enthalten, wenn nicht größere Defizite in der Bilanzsumme auftreten sollen. Die Bruttoreaktionsgleichungen für das Wachstum chemoorganotropher Aerobier ist in Gl. 5.4A in einer sehr allgemeingültigen Form angegeben. Es wurde ein Wachstum auf einer stickstofffreien C-Quelle mit anorganischem Ammonium-Stickstoff als N-Quelle angenommen. Die angegebenen Gleichungen sind auf 1 Mol Zellkohlenstoff auf der Produktseite normiert. Neben den Produkten Biomasse, Kohlendioxid und Wasser wurde die Bildung von organischen Metaboliten angenommen. Eine schrittweise Vereinfachung ergibt sich, wenn stickstofffreie Metabolite (Gl.5.4B.), oder eine Biomassebildung mit Totaloxidation im Catabolismus (Gl.5.4C.) angenommen werden. Die kleinen lateinischen Buchstaben geben Stöchiometriefaktoren wieder.



Unter der vereinfachenden Annahme stickstofffreier Metabolite vereinfacht sich die Gleichung:



Die einfachste Summengleichung erhält man für den Fall der catabolischen Endoxidation:



Die Zusammensetzung der Biomasse von *Escherichia coli* wird von verschiedenen Autoren angegeben. Dermoun und Belaïch (1979) nennen als Summenformel für das aerobe Wachstum auf Succinat  $\text{CH}_{1,56}\text{O}_{0,36}\text{N}_{0,23}$  und Ishikawa und Shoda (1983) geben einen mittleren Wert von  $\text{CH}_{1,77}\text{O}_{0,48}\text{N}_{0,235}$  an. Ähnliche stöchiometrische Daten werden auch bei Belaïch (1980) genannt. Zu Bilanzierungszwecken ist hiervon vor allem der Anteil an Zellstickstoff interessant, da die N-Quelle analytisch nicht erfaßt wurde und eine rechnerische Bestimmung des Umsatzes an Ammonium-Stickstoff notwendig ist.

Eine enthalpische Bilanz erfordert die Kenntniss der Reaktionsenthalpie  $\Delta H$  aus dem kalorimetrischen Versuch, der Stoffumsätze für das Substrat, die N-Quelle, die Biomasse, das Kohlendioxid, das Reaktionswasser und die Produkte  $P_i$ . Der Sauerstoff tritt bei der Berechnung nicht in Erscheinung, da seine Bildungsenthalpie vereinbarungsgemäß Null ist. Darüber hinaus sind die Bildungsenthalpien der verschiedenen Stoffe erforderlich (z.B. Brown, 1969). Unter Experimentalgesichtspunkten kann anstelle von Standard-Bildungsenthalpien mit Verbrennungsenthalpien gearbeitet werden, was den Vorteil besitzt, daß eine Kenntnis der Produkte Wasser und Kohlendioxid nicht erforderlich ist und ein rascher Zugriff auf die enthalpischen Daten für komplexe Produkte, wie eben die Biomasse, durch Verbrennungskalorimetrie möglich ist (siehe oben).

Eine einfache enthalpische Gleichung (Gl.5.5.) zur Beschreibung der Bilanz zu einem beliebigen Zeitpunkt während des Wachstums einer Batch-Kultur kann nun aufgestellt werden, wobei das wesentliche Problem die analytische Beschaffung der Stoffkonzentrationen ist. Die Gleichung wurde unter Zugrundelegung des Hess'schen Gesetzes und des ersten Hauptsatzes der Thermodynamik formuliert (in Christen, 1973). Eine Bildung N-haltiger Metabolite wurde nicht berücksichtigt.

$$\left[ (S_{t_0} - S_t) \Delta H_{cS} + K (BTM_t - BTM_{t_0}) \Delta H_{cNH_4OH} \right] - \left[ \int_{t_0}^t \dot{Q}(t) dt + \right. \\ \left. (BTM_t - BTM_{t_0}) \Delta H_{cBTM} + \sum_{i=1}^n ((P_{i(t)} - P_{i(t_0)}) \Delta H_{cPi}) \right] = 0$$

(Gl. 5.5.)

Betrachten wir die Besonderheiten des Modellsystems Chemostat, so können wir im ungestörten Betrieb ein steady-state annehmen, d.h. die Konzentrationen von Substraten und Produkten sind zeitlich konstant und die Stoffumsätze somit lediglich das Produkt aus Stoffkonzentration und Dilution-Rate, womit sie zugleich auf ein Normvolumen des Systems (hier 1 Liter) standardisiert werden. Eine derartige Normierung findet bei der Berechnung der kalorischen Daten ebenfalls statt, um den Leser vom lästigen Umrechnen apparatebezogener Wärmestromdaten, wie sie die Literatur leider zuhauf bevölkern, zu befreien. Sowie jedoch eine dynamische Änderung am Chemostaten, z.B. durch Noxen oder durch zusätzliche Substratgaben einsetzt, werden eben diese Konzentrationen zu Funktionen der Zeit und eine Energieflußbilanz muß ebenfalls als Funktion der Zeit in der Form kalkuliert werden, daß momentane Stoffumsätze anstelle integraler Werte verwendet werden, was mit Gl. 5.6. ausgedrückt wird.

$$\left[ \dot{S} \Delta H_{cS} + K \dot{B} T \Delta H_{cNH_4OH} \right] - \left[ \dot{Q} + \dot{B} T \Delta H_{cBTM} + \sum_{i=1}^n (\dot{P}_i \Delta H_{cPi}) \right] = 0$$

(Gl. 5.6.)

Eine zusätzliche Komplikation tritt ein, wenn organische Produkte gebildet werden, die vom mikrobiellen System grundsätzlich auch als Substrate verwertet werden können, so daß sie während Phasen einer positiven Netto-Produktbildung auf der Produktseite erscheinen müßten, während sie in Phase mit negativer Netto-Produktbildung, das heißt, wenn die mikrobielle Verwertung die mikrobielle Synthese dieses Produktes übersteigt, auf der Substratseite in Erscheinung treten müßten. Eine praktikable Lösung bietet sich an, wenn die Verbrennungsenthalpieflüsse der organischen Produkte auf der Substratseite so berücksichtigt werden, daß der analytisch ermittelte enthalpische Umsatz vermindert um die Netto-Produkt-Ströme erscheint (thermochemisch ist dabei auf richtige Vorzeichen zu achten).

Die Erhebung momentaner Stoffumsätze ist Aufgabe der analytischen Aufbereitung der notwendigerweise diskreten Konzentrationsmessungen und wurde nach den Gleichungen 5.7. bis 5.10. ausgeführt, wobei die Ermittlung der ersten Ableitung nach der Zeit mit Hilfe einer Spline-Anpassung vorgenommen wurde, die Bestandteil des Software-Paketes MEN ist (Jacob und Jancar, 1985).

$$\dot{S} = D (S_r - S) - \frac{dS}{dt} \quad (G1.5.7.)$$

$$\dot{BTM} = D BTM + \frac{dBTM}{dt} \quad (G1.5.8.)$$

$$\frac{\dot{NH}_4OH}{4} = K BTM \quad (G1.5.9.)$$

$$\dot{P}_1 = D P + \frac{dP_1}{dt} \quad (G1.5.10.)$$

Eine enthalpische Bilanzierung ist jedoch nur eine, und zwar die komplexeste, Art, um Ergebnisse aus Chemostat-Experimenten aufzubereiten. Einfachere Ansätze, die möglicherweise effizienter sind, bieten qualitative Bewertungen von Wärmestrom-Zeit-Kurven, die von uns bereits als Methode vorgeschlagen wurde (Weppen und Schuller, 1984a) und sich in guter Gesellschaft mit Methoden zur Bewertung Kalorimetrischer Messungen der Wirkung von Antibiotika befindet (Chowdhry et al, 1983; Schaarschmidt et al, 1979). Dieses Verfahren wird am Beispiel *Acinetobacter* demonstriert (s.u.).

Ein vielversprechender Ansatz besteht in der Ermittlung des energetischen Yield-Koeffizienten, der bei Prochazka et al (1970) in einer fundamentalen Form definiert wird und von uns (Schuller und Weppen, 1983; Weppen, 1983) in einer rein energetischen Definitionsform vorgeschlagen wird. Er beschreibt die enthalpische Effizienz der bakteriellen Biosynthese und erfordert nur die Kenntnis der Wärmemenge und Biomasse oder, in der abgeleiteten Form des Wärmestromes und der Biosyntheserate. Gleichung 5.11. zeigt unsere Definition des energetischen Yieldkoeffizienten. G1.5.11A. gibt eine spezielle Definition für die Chemostat-Kultur, die auf momentanen Stoffumsätzen basiert.

$$Y_e = \frac{(BTM_t - BTM_{t_0}) \Delta H_{cBTM}}{(BTM_t - BTM_{t_0}) \Delta H_{cBTM} + \int \dot{Q}(t) dt} \quad (G1.5.11.)$$

$$Y_e = \frac{\dot{BTMAH}_{CBTM}}{\dot{BTMAH}_{CBTM} + \dot{Q}} \quad (Gl. 5.11A.)$$

Neben diesen drei Konzepten, die darauf ausgelegt sind, sensitive Größen für den physiologischen Zustand der Chemostatkultur über die Zeit zu gewinnen, sind auch Bewertungsansätze ausführbar, die einen der kontinuierlich oder semikontinuierlich erfassbaren Parameter heranziehen, wie es z.B. im Monitoring von Belebtschlammanlagen mit Hilfe des CSB praktiziert wird. Hier sollen die analytische Resultate vor allem zur Interpretation stoffbezogener Dosis-Wirkungskurven herangezogen werden, um die angestrebte differenzierende Toxizitätseinschätzung vornehmen zu können.

### 5.3.1. Kalorimetrische Ergebnisse an *Acinetobacter*

*Acinetobacter* wurde als erstes mikrobielles Modell dieser Arbeit mit einem kleinen experimentellen Design bearbeitet, das auf die Erfassung von Biomassekonzentrationen über die Zeit, von Wärmestromdaten über die Zeit und den daraus kalkulierbaren energetischen Yield zielte. Das Ergebnismaterial liegt praktisch vollständig veröffentlicht vor (Weppen und Schuller, 1984a), so daß nur ganz knapp wesentliche Ergebnisse berichtet werden, die unter den Betriebsparametern nach Tabelle 5.5. ermittelt wurden.

**Tabelle 5.5.: Die wachstumskinetischen Parameter und experimentellen Arbeitsbedingungen für *Acinetobacter calcoaceticus* auf Acetat-Medium.**

| Parameter                    | Symbol      | Wert |        |
|------------------------------|-------------|------|--------|
| Limitierendes Substrat       | $S_r$       | 6    | mMol/l |
| Maximale spez. Wachstumsrate | $\mu_{max}$ | 1.22 | 1/h    |
| Substrataffinität            | $K_s$       | 0.9  | mMol/l |
| Kritische Wachstumsrate      | $\mu_c$     | 1.08 | 1/h    |
| Molarer Yield-Koeffizient    | $Y_m$       | 19   | g/Mol  |
| experimentelle Dilution-Rate | $D$         | 0.54 | 1/h    |

weitere Details zum experimentellen Vorgehen in Weppen und Schuller, 1984a

### 5.3.1.1. Graphische Toxizitätsbewertung

Die Abbildungen 5.6. und 5.7. zeigen das einfachste graphische Bewertungsverfahren für Reaktionen der Chemostatkultur gegenüber Batch-Dosierungen von Teststoffen, indem die maximale Änderung der Wärmestrom-Zeit-Kurve als Maß für die Konzentrations-Wirkungsbeziehung herangezogen wird. Das hohe Signifikanzniveau der Chemostatkultur im steady-state mit typischen Schwankungsbreiten der Wärmestrom-Zeit-Funktion von  $\sigma = 2.5\%$  innerhalb eines Versuchslaufes und  $\sigma = 4.7\%$  zwischen unabhängigen Versuchsläufen erlaubte die Abschätzung einer minimalen inhibierenden Konzentration (MIC) und einer minimalen effektiven Konzentration (MEC), falls die Wärmestromkurven über die steady state Linie hinausreichen, die für Acinetobacter zusammen mit kalorimetrisch ermittelten IC 50 Schätzwerten nach graphischer Auswertung in Tabelle 5.6. zusammengefaßt sind.

**Tabelle 5.6.: Graphisch ermittelte Schätzer für biologische Effekte der Modellchemikalien gegenüber Acinetobacter im kalorimetrischen Testverfahren.**

| Substanz §              | MEC<br>[µMol/l] | MIC<br>[µMol/l] | IC-50<br>[µMol/l] |
|-------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Phenol                  | 2550            | 6800            | 8820              |
| 2,4-Dinitrophenol       | 35              | 370             | 570               |
| 4-Nitrophenol           | 180             | 470             | 575               |
| 2-Nitrophenol           | n. b.           | 25              | 108               |
| Pentachlorphenol        | n. b.           | 0.83            | 1.69              |
| Quecksilber-II-chlorid§ | n. b.           | 160             | 320               |

§ Quecksilber-Nominalkonzentrationen weichen stark von Wiederfindungsergebnissen ab (siehe Text).

§ Daten aus Weppen und Schuller, 1984a

alle Konzentrationsangaben in µMol/l nominal im Moment der Teststoffzugabe (Batch-Gabe); Quecksilber in µg Hg/l

Das graphische Verfahren der Bewertung kalorimetrischer Toxizitätsmessungen mag zunächst etwas willkürlich erscheinen, es stellt aber im Prinzip eine ähnliche Methodik dar, wie andere Endpunktmethoden auch, bei denen unter Praktikabilitäts Gesichtspunkten irgendwie geartete Beobachtungskriterien herangezogen werden. Eine bewertende Diskussion der Interpretationstechniken soll sich jedoch erst im Diskussionsteil anschließen, da dann die verschiedenen Betrachtungsebenen nebeneinander verfügbar sind.

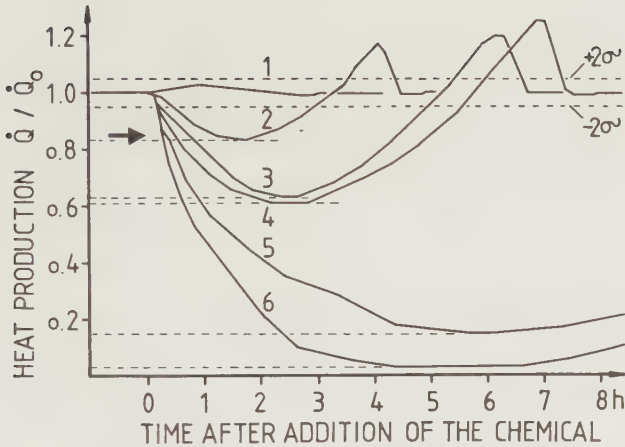


Abbildung 5.6.: Reaktion der Wärmeproduktion von *Acinetobacter calcoaceticus* in der Chemostat-Kultur nach Batch-Zugabe von 2-Nitrophenol: 1) 26  $\mu\text{Mol/l}$ ; 2) 39  $\mu\text{Mol/l}$ ; 3) 51  $\mu\text{Mol/l}$ ; 4) 79  $\mu\text{Mol/l}$ ; 5) 367  $\mu\text{Mol/l}$ ; 6) 510  $\mu\text{Mol/l}$ . Einzelgezeichnet wurden die Ablesungen für die graphische Toxizitätsbewertung und das Signifikanzniveau. Aus: Weppen und Schuller, 1984a.

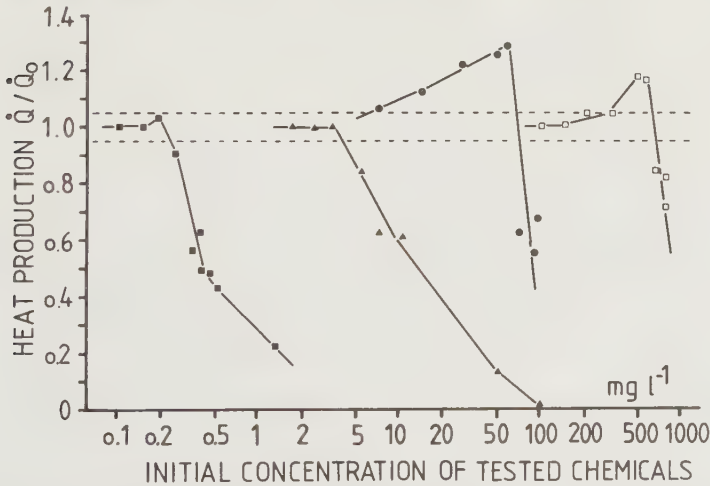


Abbildung 5.7.: Die relative Wärmeproduktion als Funktion der Teststoffkonzentration (log-skaliert). ■  $\text{HgCl}_2$ ; ▲ 2-Nitrophenol; ● 2,4-Dinitrophenol; □ Phenol. Aus: Weppen und Schuller, 1984a.

### 5.3.1.2. Biologische Aktivitäten: Energy-Yield

Die zuvor beschriebene graphische Toxizitätsbewertung entspricht dem Minimalkonzept des Kalorimetrischen Verfahrens, sie erfordert lediglich die Verfügbarkeit der Wärmestrom-Zeit-Diagramme ohne weitergehende analytische Daten. Zur Demonstration weitergehender Datenbehandlungsverfahren werden im Folgenden Daten zur Wirkung von PCP auf Chemostat-Kulturen von *Acinetobacter* verwendet, die aus einer früheren Arbeit stammen (Weppen, 1983). Die Wärmestrom-Zeit-Funktionen gibt Abb. 5.8A. wieder.

Unter Einbeziehung der Biomasse-Konzentrations-Daten, (Abb. 5.8B.) die mit Hilfe der Messung der scheinbaren Extinktion der Bakteriensuspension gewonnen wurden (vgl. Weppen, 1983), war es möglich, abgeleitete Größen zu berechnen, die Aufschluß über toxische Wirkungen der Modellchemikalien geben können.

Die spezifische Wachstumsrate von Bakterien in der Batch-Kultur kann nach Herbert, Elsworth und Telling (1956) in der Form von Gl. 5.12. beschrieben werden.

$$\mu_{\text{(Batch)}} = \frac{1}{\text{BTM}} \frac{d(\text{BTM})}{dt} = \frac{d(\ln \text{BTM})}{dt} \quad (\text{Gl. 5. 12})$$

$$\mu_{\text{(Chem. )}} = \frac{1}{\text{BTM}} \frac{d(\text{BTM})}{dt} + D \quad (\text{Gl. 5. 13})$$

In der Chemostat-Kultur muß zu dieser Wachstumsrate die Dilution-Rate addiert werden, um die spezifische Wachstumsrate bei gegebener Dilution-Rate zu berechnen (Gl. 5.13). Das Verfahren wurde mit einer Spline-Anpassung zur Berechnung der ersten Ableitung realisiert und lieferte auf der Grundlage der Biotrockenmasse-Konzentrationsmessungen die spezifische Wachstumsrate als Funktion der Zeit. Das Produkt aus Wachstumsrate und Biotrockenmassekonzentration lieferte die Biosyntheserate (vergl. hierzu Gl. 5.8.), die als Verbrennungsenthalpie ausgedrückt wurde. Die zeitlichen Daten der Wärmestromkurve und der Bioproduktionskurve erlaubten nun die Berechnung des energetischen Yields nach Gl. 5.11A. Abbildung 5.8. veranschaulicht die einzelnen Schritte.

Eine quantitative Bewertung des energetischen Yield-Koeffizienten sollte, obschon er im Fallbeispiel recht kräftig auf eine Intoxikation hinweist, nicht überstrapaziert werden, da die Fehlerfortpflanzung aufgrund der zahlreichen Rechenoperationen, insbesondere zur Herleitung der ersten Ableitungen, zu weiten Vertrauensbereichen führt. Abschätzungsweise können wichtige Fehlerquellen in den Messreihen wie folgt angenommen werden:

- Fehler der Wärmestrom-Zeit-Funktion insbesondere an Stellen mit großen zeitlichen Änderungen
- Fehler in der Biotrockenmassebestimmung mit typisch 2.5% Streubreite bei der Trübungsmessung.
- Unterschiedliche zeitliche Auflösung der Messreihen zum Wärmestrom und zu den Biomassedaten.
- Zeitliche Fehler in der Zuordnung von Biomassedaten und Wärmestromdaten (*Kohärenz-Fehler*).

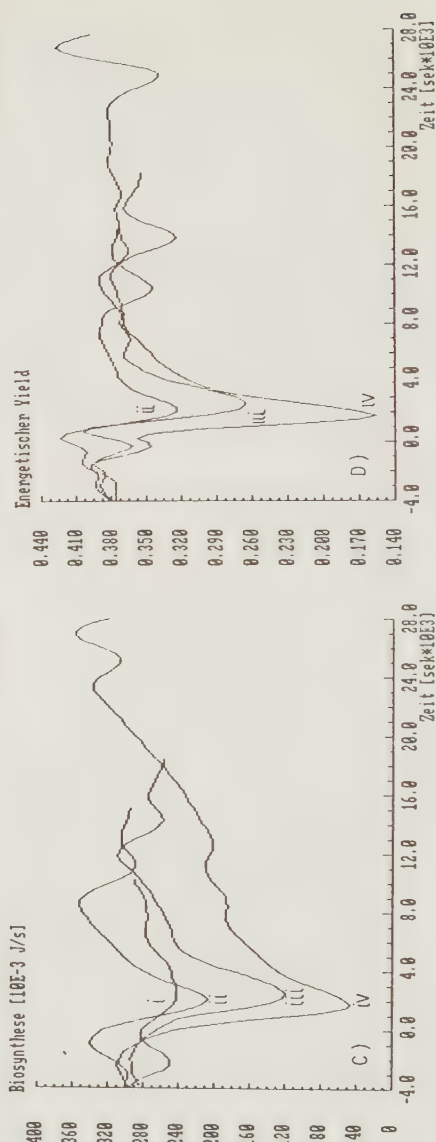
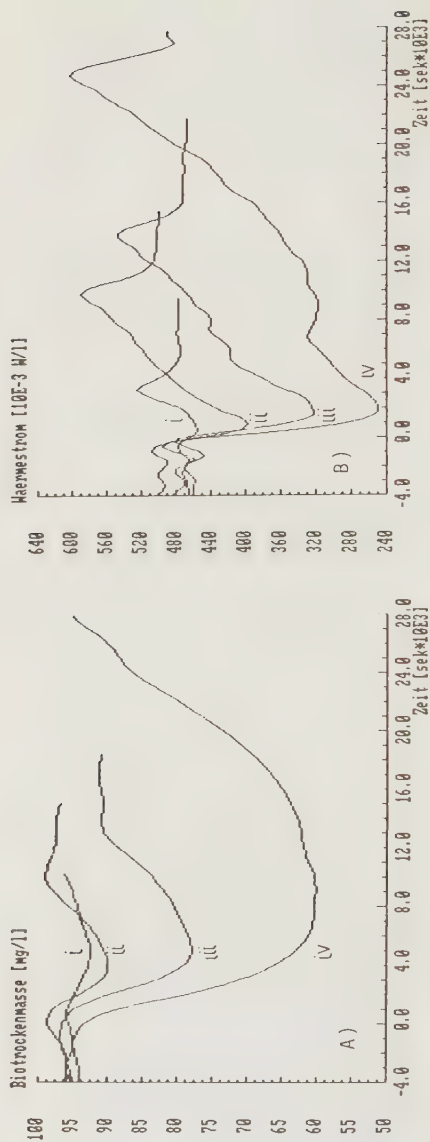
Bedingt durch die diskrete Erhebung von Biotrockenmassedaten und eine notwendige rechnerische Ausmittlung bei der Berechnung der Ableitungen ergeben sich notwendigerweise Dämpfungserscheinungen, wenn kurzzeitige Änderungen der Biosyntheserate auftreten, was durch erhöhte Sampling-Raten oder ähnliche Maßnahmen nicht eliminiert werden kann, da dann die Unsicherheiten aufgrund der analytischen Fehler immer stärker in Erscheinung treten (vergl. Kap. 4.1.).

---

Abbildung 5.8.: Herleitung der abgeleiteten Parameter Biosyntheserate und energetischen Yield aus den Meßdaten des Wärmestromes und der Biotrockenmassekonzentration. Die Biotrockenmassedaten (A) wurden mit Hilfe einer Spline-Approximation (siehe Text) in spezifische Wachstumsraten umgesetzt, die als Produkt mit der Biomassekonzentration (A) und dem Brennwert der Biomasse die Biosyntheserate (B) in Brenneinheiten ergaben.

Die Berechnung des energetischen Yields erfolgte anhand der Definitionsgleichung (siehe Text) unter Verwendung der Wärmestrom-Zeit-Daten (C). Der Yield-Koeffizient ist in (D) dargestellt.

Die Rohdaten entstammen meiner Diplom-Arbeit (Weppen, 1983). Die Diagramme enthalten die Messreihen zu *Acinetobacter calcoaceticus* nach Batch-Intoxikation mit 0.67  $\mu\text{Mol PCP/l}$ ; 1.34  $\mu\text{Mol PCP/l}$ ; 2.68  $\mu\text{Mol PCP/l}$  und 5.36  $\mu\text{Mol PCP/l}$  jeweils als Nominalkonzentration bei  $t_0$  (Kurve I bis IV).



Eine eingehendere Behandlung der Fehlerbetrachtung soll hier unterbleiben, da die Fehlerbetrachtung für abgeleitete Größen ein recht schwerwiegendes statistisches Problem darstellt, dessen Behandlung außerhalb der hier betrachteten Arbeitsgegenstände liegt.

Unter qualitativen Gesichtspunkten kommt dem energetischen Yield jedoch eine interessante Rolle zu, da er Hinweise auf die Effizienz der Koppelung katabolischer und anabolischer Stoffflüsse liefert, die in eine Modellbildung einfließen können, wie in Kap. 6. diskutiert wird.

### 5.3.2. Kalorimetrische Ergebnisse an *Escherichia coli*

*Escherichia coli* wurde im Rahmen dieser Arbeit am ausführlichsten bearbeitet. Neben der kalorimetrischen Toxizitätsbewertung nach dem graphischen Verfahren bei mittlerer Wachstumsrate wurden Untersuchungen zur Produktbildung und Substratverwertung angestellt. Verschiedene D-Raten im Betrieb der Chemostat-Kultur dienten der Simulation verschiedener physiologischer Ausgangszustände im Moment der Teststoffzugabe (Batch-Dosis) und Untersuchungen mit einer Langzeitdarbietung von verschiedenen PCP-Konzentrationen bei mittlerer D-Rate und Limitierung des bakteriellen Wachstums durch die N-Quelle beziehungsweise die Kohlenstoffquelle sollten die Frage nach der Übertragbarkeit von Batch-Dosis Resultaten auf Langzeiteffekte klären.

Das Monitoring-Programm erreichte mit den Untersuchungen an *Escherichia coli* die komplexesten Ausmaße innerhalb dieser Arbeit, erste Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Schuller und Weppen, 1984; Weppen, 1985).

#### 5.3.2.1. Graphische Toxizitätsbewertung

Das graphische Bewertungsverfahren von Wärmestrom-Zeit-Kurven zur Ermittlung von Toxizitätsschätzwerten war identisch mit dem Verfahren bei *Acinetobacter* (Weppen und Schuller, 1984a). Die Resultate sind nach Dilution-Raten getrennt in Tabelle 5.7. zusammengestellt. Quecksilber wurde nicht berücksichtigt. Wärmestrom-Kurven zur Veranschaulichung bietet Abbildung 5.10. und die Hilfsgraphiken für die Bewertung der Toxizität zeigt Abbildung 5.9.

**Tabelle 5.7.: Graphisch ermittelte Toxizitätsschätzwerte aus kalorimetrischen Daten für *Escherichia coli* bei verschiedenen Dilution-Raten der Chemostat-Kultur.**

| Substanz          | D-Rate<br>[1/h] | MEC<br>[μMol/l] | MIC<br>[μMol/l] | IC 50<br>[μMol/l] |
|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Phenol            | 0.16            | 2800            | n. b.           | n. b.             |
|                   | 0.43            | 1800            | 6900            | 18000             |
|                   | 0.75            | n. b.           | 2800            | 11000             |
| Pentachlor-phenol | 0.16            | 40              | 290             | 340               |
|                   | 0.43            | 40              | 340             | 400               |
|                   | 0.75            | 100             | 260             | 340               |
| 2-Nitrophenol     | 0.16            | <100            | 640             | 700               |
|                   | 0.43            | <100            | 160             | 1400              |
|                   | 0.75            | n. b.           | 140             | 610               |

n. b.: der Effekt wurde im untersuchten Konzentrationsbereich nicht beobachtet.

### 5.3.2.2. Biologische Aktivität - Dynamik

Betrachtet man die Zusammenstellung der Wärmestrom-Zeit-Kurven von Abbildung 5.10., so wird deutlich, daß einerseits zwischen der Reaktion der Chemostatkultur nach Zugabe von Teststoffen und andererseits zwischen dem Verlauf der Wiederherstellung des steady-state Zustandes nach dieser vorübergehenden Störung und der Dilution-Rate ein Zusammenhang besteht, der noch zu erörtern ist. Es fällt auf, daß bei niedriger steady-state Wachstumsrate Effekte, die eine Wärmestromerhöhung gegenüber dem Steady-state bewirken, sehr stark in Erscheinung treten. Im Zuge der Wiederherstellung des steady-state Zustandes der Kulturen treten große Zuwachsraten der Wärmestromkurve auf. Bei sehr hoher steady-state Wachstumsrate treten Wärmestromerhöhungen über den steady-state-Level nur in geringem Grad auf und die Wiedererholung verläuft asymptotisch gegen den Gleichgewichtszustand.

Untersuchungen mit verschiedenen Dilution-Raten wurden gerade zu diesem Zweck, Zusammenhänge zwischen dem physiologischen Zustand der Bakterienpopulation und ihrer Reaktivität zu erkennen, angestellt, die eingehende Diskussion benötigt aber die anschließenden Ergebnisse, so daß im Moment keine weiteren Details behandelt werden sollen.

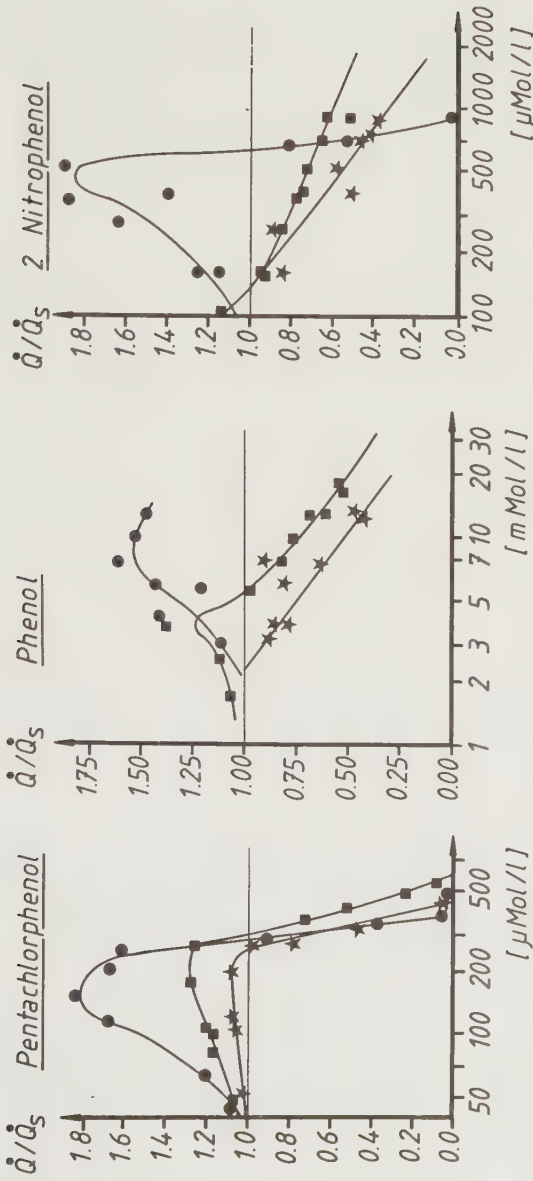


Abbildung 5.9.: Hilfsgraphiken zur graphischen Toxizitätsbewertung an *Escherichia coli*.  
 Zum Verfahren siehe Text und Abbildungen 5.6. und 5.7.  
 Resultate der kalorimetrischen Toxizitätsbestimmung wurden für drei verschiedene  $D$ -Raten und drei Modellchemikalien wiedergegeben.  
 ●  $D=0.16/\text{h}$ ; ■  $D=0.43/\text{h}$ ; ★  $D=0.75/\text{h}$

### 5.3.2.3. Biologische Aktivitäten - Energy-Yield

Der Energy-Yield, wie bereits bei den Ergebnissen mit *Acinetobacter* beschrieben, besitzt m.E. vor allem qualitativen Wert für die Modellbildung, da er eine vereinheitlichende Beschreibung der energetischen Effizienz des Biosystems erlaubt (Schuller und Weppen, 1983). Er eignet sich offensichtlich, um spezifisch auf Effekte von Chemikalien gegenüber dem energetischen Wirkungsgrad des bakteriellen Stoffwechsels hinzuweisen, was jedoch nur durch Testung einer größeren Zahl von Chemikalien als der hier verwendeten, abgesichert werden kann.

Für die kalorimetrisch untersuchten Modellschubstanzen gibt Abb. 5.11. eine Übersicht über Effekte gegenüber dem energetischen Yield bei drei D-Raten. Energy-Yield beeinträchtigende Effekte finden sich für alle drei Modellschubstanzen; besonders die Messreihen mit Phenol und 2-Nitrophenol zeigten hier drastische Auswirkungen. Teststoffkonzentrationen an der Grenze des MEC-Levels zeigten kaum Effekte auf den Yield auf, was aufgrund der fehlenden Reaktion in der Biomassekonzentration und der Wärmestromkurve zu erwarten war. Messreihen im Bereich zwischen MEC- und MIC-Konzentration zeigten erwartungsgemäß einen Einbruch des energetischen Yields, was aufgrund der Erhöhung der Wärmestrom-Kurve bei gleichzeitiger Abnahme der Biotrockenmassewerte zu erklären ist.

Der energetische Yield als vereinheitlichende abgeleitete Größe eignet sich demnach gut, um die Effekte zwischen der MEC und der MIC-Konzentration zu interpretieren, eine Verwendung als quantitative Maßzahl für toxische Effekte erscheint aber aus Gründen der unklaren Fehlerabschätzung mit dem vorliegenden Datenmaterial von etwa 90 Testreihen nicht angemessen.

---

Abbildung 5.10.: Die Reaktion der Chemostat-Kultur von *Escherichia coli* auf Batch-Dosierungen der Teststoffe Phenol, PCP und 2-Nitrophenol. D=0.16/h (obere Reihe) mit den PCP-Konzentrationen 113 µMol/l; 150 µMol/l; 270 µMol/l; 355 µMol/l; 475 µMol/l; 2-Nitrophenol: 162 µMol/l; 361 µMol/l; 638 µMol/l; 910 µMol/l; Phenol: 3.2 mMol/l; 5.7 mMol/l; 10 mMol/l; 13.4 mMol/l.  
D=0.43/h (mittlere Reihe): PCP: 47 µMol/l; 113 µMol/l; 270 µMol/l; 360 µMol/l; 475 µMol/l; 2-Nitrophenol: 162 µMol/l; 385 µMol/l; 513 µMol/l; 685 µMol/l; 910 µMol/l; Phenol: 3.6 mMol/l; 7.6 mMol/l; 13.4 mMol/l.  
D=0.75/h (untere Reihe): PCP: 54 µMol/l; 112 µMol/l; 270 µMol/l; 475 µMol/l; 2-Nitrophenol: 162 µMol/l; 257 µMol/l; 385 µMol/l; 683 µMol/l; 910 µMol/l; Phenol: 3.2 mMol/l; 6.1 mMol/l; 7.6 mMol/l; 13.4 mMol/l.  
Angaben als Nominalkonzentrationen im Moment der Teststoffzugabe. Zunehmende Konzentrationen mit steigender Linienstärke.

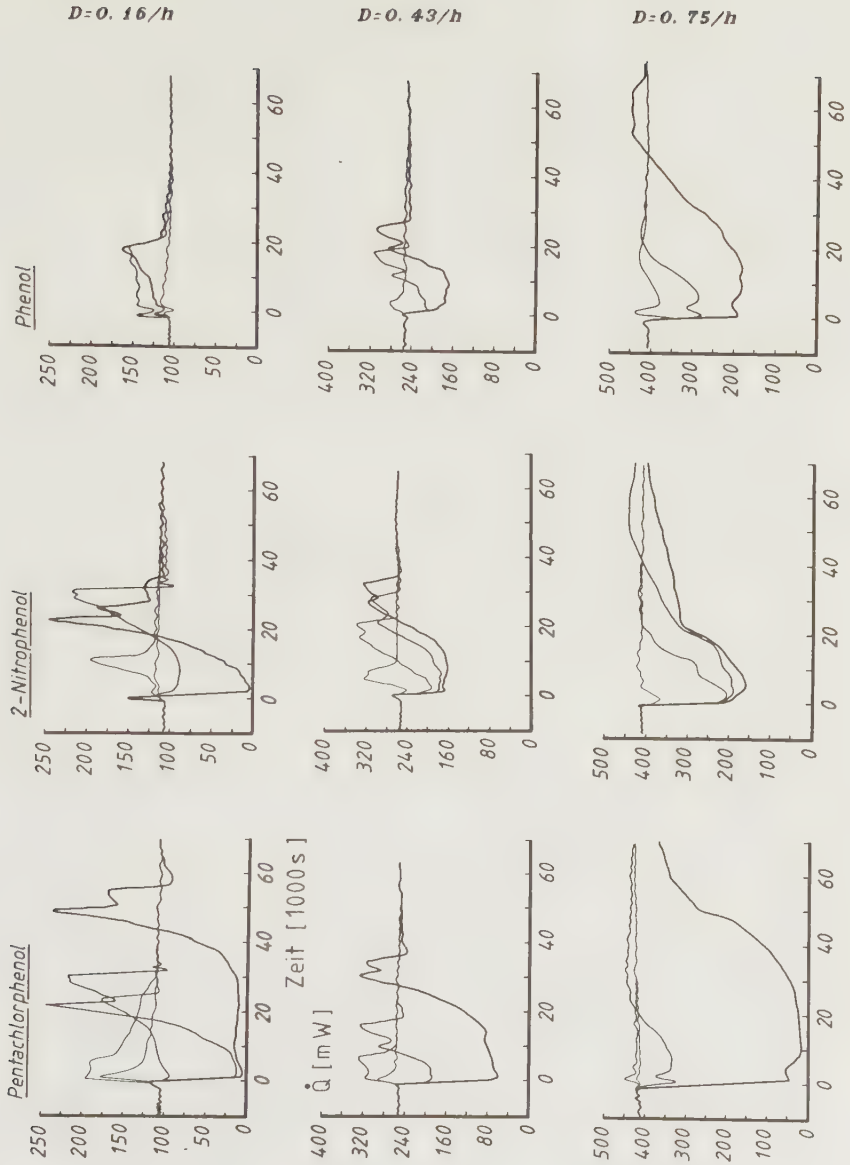


Abbildung 5.11.

#### 5.3.2.4. Biologische Aktivitäten - Enthalpiefluß

Zielte die Behandlung des energetischen Yields auf eine vereinheitlichende Interpretation von biokalorischen und bioproduktiven Messdaten am Chemostaten ab, so sollen Untersuchungen zum Enthalpiefluß etwas detaillierter Auskunft geben über die Substrat- und Produktseite der enthalpischen Biosynthese-gleichung (Gl.5.6.).

Über die oben bereits genutzten Methoden zum Monitoring der Biomasse und ihrer kalorischen Aktivität standen Analysenmethoden zur Bestimmung der Metabolite Ameisensäure, Essigsäure und Ethanol und des Substrates Glucose zur Verfügung. Die chemischen Analysen besaßen Nachweisgrenzen, die unterhalb der Sensitivität des kalorimetrischen Monitorings angesiedelt sind, so daß das Erscheinen kleiner Substrat- oder Produktkonzentrationen nicht notwendigerweise von einem beobachtbaren kalorischen Effekt begleitet war.

Unter Experimentalgesichtspunkten erschien innerhalb von zehn ausgewählten Messreihen (Zugaben von Phenol, PCP und Glucose) in keinem Falle eine nachweisbare Konzentration von Ethanol, so daß die intermediäre Bildung von Ethanol, wenngleich sie in der gemischten Säure-Fermentation von *Escherichia coli* vorkommt (Gottschalk, 1985), als unbedeutend eingestuft wurde und im weiteren Vorgehen nicht mehr berücksichtigt wurde. In Gegenwart von 2-Nitrophenol war eine Ethanol-Analytik aufgrund der überlagernden Spektren nicht möglich.

Die intermediäre Bildung von Essigsäure wurde regelmäßig beobachtet und dementsprechend ständig analytisch kontrolliert, während die Bedeutung von Formiat als Intermediärstoff unter aeroben Bedingungen ziemlich unklar blieb, worauf noch eingegangen werden soll.

---

Abbildung 5.11.: Der energetische Yield als sensitiver Indikator für physiologische Effekte der Modellchemikalien PCP, 2-Nitrophenol und Phenol gegen *Escherichia coli*.

Die drei Substanzen zeigten im Bereich zwischen der MIC- und der IC-50-Konzentration (vgl. graphische Bewertung der Toxizität) deutliche Effekte gegenüber dem Energy-Yield. Unterhalb der MEC-Konzentration war dieser Effekt erwartungsgemäß nicht mehr zu beobachten, wie die obere Reihe von Diagrammen zeigt.

Die Diagramme enthalten Daten für die Dilution-Raten  $D=0.75/h$  (dicke Linie),  $D=0.43/h$  (mittlere Linienstärke) und  $D=0.16/h$  (feine Linie). Der Energy-Yield im Steady-State stieg mit zunehmender D-Rate an.

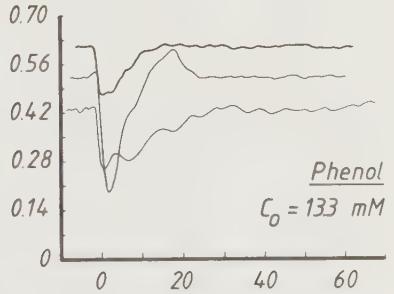
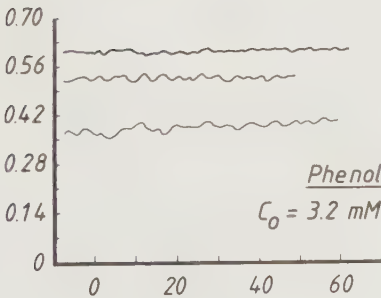
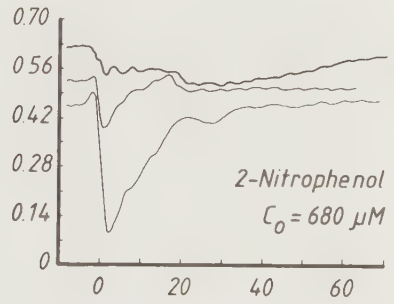
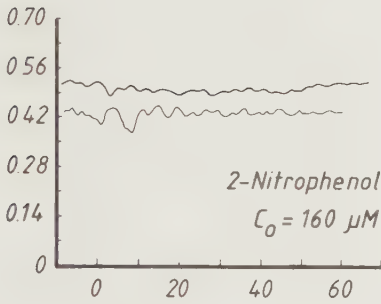
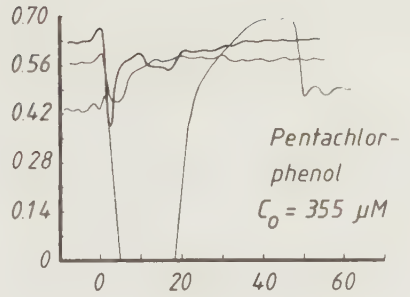
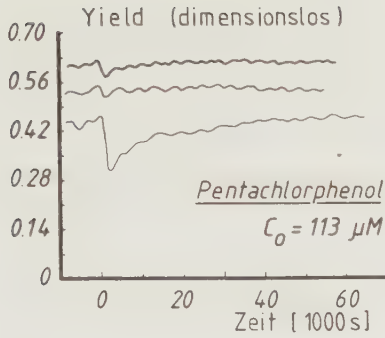


Abbildung 5.11.: links, niedrige Teststoffkonzentration  
rechts, hohe Teststoffkonzentration

Beispiele für intermediäre Konzentrationen der Substrate und Produkte geben die Abbildungen 5.12A. bis 5.12D. für die Biotrockenmasse-, die Glucose-, die Acetat- und Formiat-Konzentrationen aus Messreihen mit 2-Nitrophenol bei den Dilution-Raten von 0.16/h, 0.43/h und 0.75/h und verschiedenen Teststoffkonzentrationen im Moment der Zugabe. Die Abbildungen geben bewußt nur die tatsächlichen Messwerte wieder und nicht die interpolierende Spline-Anpassung, um die Dichte der analytisch erhobenen Zeitreihen zu demonstrieren. Wie in allen hier referierten Untersuchungen am Chemostaten, wurde der Teststoff bei  $t=0$  als konzentrierte Dosis zugegeben, die im Reaktor zur angegebenen Nominalkonzentration führte und danach der üblichen Verweilzeitcharakteristik des Chemostaten unterlag.

Aus den analytisch erhobenen Messreihen wurde mit Hilfe der interpolierenden Spline-Anpassung, die die erste Ableitung und die genäherte Grundfunktion zur Verfügung stellte (Jacob und Jancar, 1985), eine Berechnung der Stoffumsätze nach den Gleichungen 5.7. bis 5.10. ausgeführt. Zur Übertragung in einen energetischen Maßstab wurden die Verbrennungsenthalpien der Komponenten herangezogen, die in Tab. 5.8. zusammengestellt sind. Der Umsatz an  $\text{NH}_4\text{OH}$  wurde anhand der Summenformel der Bakterienmasse aus den Biotrockenmassedaten errechnet. Zur Darstellung gelangten die Ergebnisse in der Form, daß einerseits der Enthalpiefluß aus Wärmestrom und Biotrockenmasse summiert wurde und andererseits der Substratumsatz vermindert um den Umsatz der Intermediärstoffe aufgetragen wurde, so daß die entsprechenden Summenkurven, sofern die Bilanzen alle enthalpisch bedeutsamen Stoffströme enthalten und von analytischen Fehlern frei sind, deckungsgleich verlaufen sollten.

---

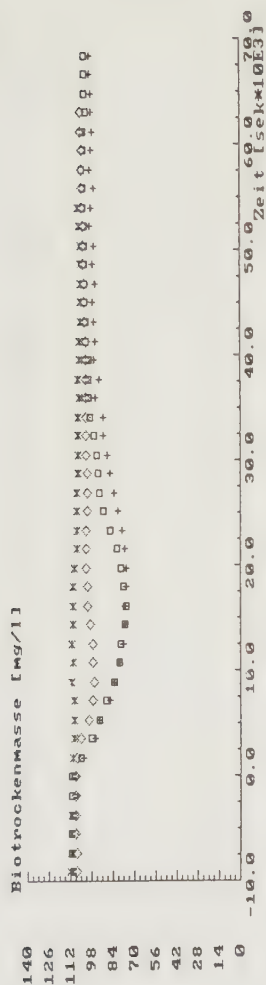
**Abbildung 5.12.: Die analytischen Basisdaten für die enthalpische Bilanzierung an der Chemostat-Kultur von *Escherichia coli* unter Belastung mit Teststoffen.**

Als analytische Basisdaten wurden Zeitreihen über die Biotrockenmasse-Konzentration (A); die Glucose-Konzentration (B); die Acetat-Konzentration (C) und die Formiat-Konzentration (D) erhoben.

Der zeitliche Verlauf des Effektes von Batch-Gaben von 2-Nitrophenol mit den Nominalkonzentrationen 385  $\mu\text{Mol/l}$  (  $\diamond$  ); 680  $\mu\text{Mol/l}$  (  $\square$  ) und 910  $\mu\text{Mol/l}$  ( + ) unterschied sich nicht nur in Abhängigkeit von der Teststoffkonzentration, sondern auch infolge unterschiedlicher D-Raten der Chemostat-Kultur, wie an den Beispielen für die D-Raten 0.16/h; 0.43/h und 0.75/h zu erkennen ist.

Abbildung 5. 12. A:

$D=0.16/h$



$D=0.43/h$



$D=0.75/h$



Abbildung 5. 12. B:

$D=0,16/h$

$D=0,43/h$

$D=0,75/h$

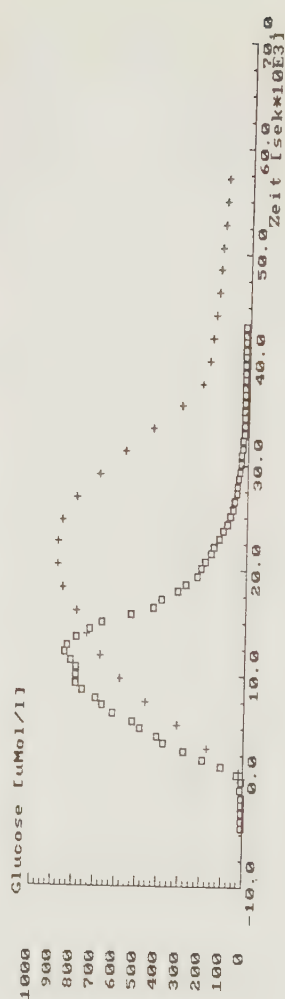


Abbildung 5. 12. C:

$D=0,16/h$

$D=0,43/h$

$D=0,75/h$

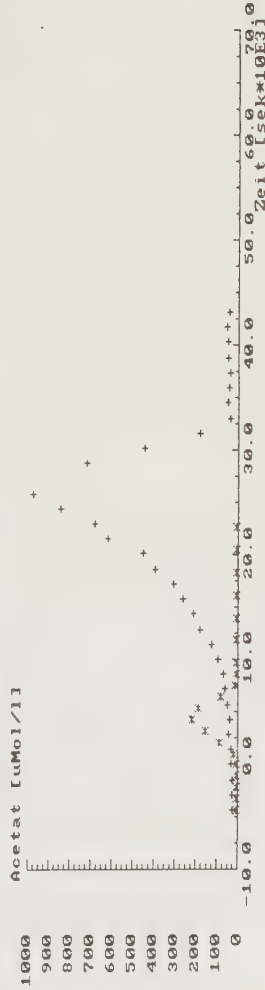


Abbildung 5. 12. D:

$D = 0.16/h$



$D = 0.43/h$



$D = 0.75/h$



| Substanz                           | Verbrennungsenthalpie     | Quelle $\Delta H^\circ_f$ -Daten |
|------------------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| Glucose aq.                        | - 2814 kJ/mol             | Brown (1969)                     |
| Essigsäure aq.                     | - 875 kJ/mol              | Brown (1969)                     |
| Ameisensäure                       | - 263 kJ/mol              | Müller (1970)                    |
| NH <sub>4</sub> OH aq <sup>#</sup> | - 412 kJ/mol              | Brown (1969)                     |
| Escherichia coli <sup>\$</sup>     | - 589 kJ/mol <sup>§</sup> | Morowitz (1978)                  |
| Biotrockenmasse                    |                           | diese Arbeit                     |

<sup>\$</sup> zur Berechnung wurde die Biotrockenmasse-Summenformel von Ishikawa und Shoda (1983) für aschefreie Biotrockenmasse angenommen; CH<sub>1,77</sub>O<sub>0,48</sub>N<sub>0,233</sub> entsprechend 24,74 g/mol Zellkohlenstoff.

<sup>§</sup> kJ/mol Zellkohlenstoff

<sup>#</sup> der Umsatz an NH<sub>4</sub>OH errechnet sich aus der Summenformel zu 0,233 mol NH<sub>4</sub>OH/mol Zellkohlenstoff

**Tabelle 5.8.: Verbrennungsenthalpien der analytisch berücksichtigten Komponenten. Als Verbrennungsprodukte wurden Wasser, gasförmiges Kohlendioxid und wässrig gelöste Salpetersäure angenommen.**

Die Ergebnisse der enthalpischen Stofffluß-Bilanzierungen für *Escherichia coli* und 910 µMol 2-Nitrophenol/l sind in Abbildung 5.13. für die D-Raten 0,16/h, 0,43/h und 0,75/h wiedergegeben. Der Effekt auf den Brutto-Stoffumsatz, d.h. das Kohlenstoffsubstrat Glucose mit den intermediären Produkten Acetat und Formiat, war bei hoher D-Rate kräftig und signifikant, es fand sich eine hohe Syntheserate für Essigsäure und Ameisensäure. Bei niedrigeren D-Raten verschwand der Effekt auf den Glucose-Umsatz ebenso wie die Synthese von Ameisensäure nahezu vollständig. Essigsäure trat weiterhin als intermediäres Produkt in Erscheinung. Eine recht beachtliche Lücke in der enthalpischen Stoffflußbilanz konnte, wie in allen Messreihen, mit den verfügbaren analytischen Daten oder den Fehlerbreiten der Analysenmethoden nicht erklärt werden. Diese Lücke vergrößerte sich in den Testreihen mit 2-Nitrophenol nach Teststoffgabe erheblich.

Ergebnisse mit Phenol sind in Abbildung 5.14. für die beiden extremen D-Raten D=0,16/h und D=0,75/h mit den Nominalkonzentrationen 3,2 mMol/l und 13,4 mMol/l wiedergegeben. Das Beispiel 5.14B. erscheint besonders interessant, da es deutlich zeigt, wie eine Erhöhung der Wärmebildung mit einer gleich-

zeitigen Verminderung der Biomasseproduktion so einherging, daß der enthalpische Fluß in der Summe innerhalb der Substrat-Umsätze verblieb. Diese Beobachtung deutet auf die prinzipielle Zulässigkeit des methodischen Ansatzes hin, da keine Verletzung des ersten Hauptsatzes der Thermodynamik vorliegt.

Die Resultate zu Pentachlorphenol-Intoxikationen sind in Abbildung 5.15. zusammengestellt und erübrigen eine Erörterung nahezu, da die Beobachtungen sich mit den Resultaten der Phenol-Reihe einigermaßen ähneln. Abweichend von den Ergebnissen mit 2-Nitrophenol verringerte sich nach PCP-Zugabe die Bilanzierungslücke vorübergehend, was möglicherweise mit abweichenden Wirkungen auf den Metabolismus zu erklären ist, u.U. aber auch ein Artefakt der Untersuchungen mit 2-Nitrophenol ist, der auf einer Störung der enzymatischen Glucose-Analytik mit zu geringen Konzentrationsdaten in Gegenwart von 2-Nitrophenol beruht.

#### **5.3.2.5. Long-Term Toxizitätstests an *Escherichia coli***

Bei den bisher referierten Toxizitätstests wurde die Bakterienpopulation in der Chemostat-Kultur schockartig mit den zu testenden Substanzen in Kontakt gebracht, ein Verfahren, das der Simulation von Unfallsituationen dienlich sein kann. Im Folgenden wird von diesem Prinzip abgegangen und für die Modellsubstanz Pentachlorphenol eine Langzeitbelastung simuliert. Die zugrunde liegende Frage ist, ob die oben beschriebenen Beobachtungen ein Resultat der tatsächlichen Exposition der Bakterienpopulation oder aber der Exposition zusammen mit adaptativen Reaktionen der Population sind. Hierbei wurden zwei Modellfälle unterschieden, zum einen die Chemostat-Kultur mit limitierter C-Quelle, zum anderen eine N-limitierte Chemostat-Kultur, in der das Kohlenstoffs substrat ad Libitum verfügbar war. Die Arbeitsbedingungen sind in Tabelle 5.9. zusammengestellt.

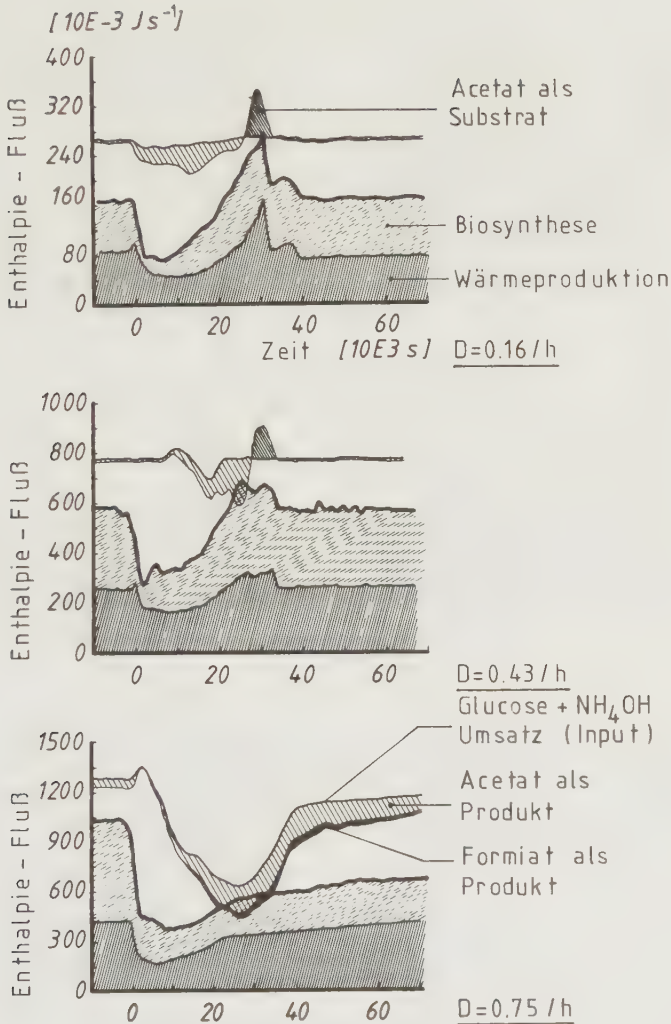


Abbildung 5.13.: Enthalpische Bilanzierung des Einflusses von 2-Nitrophenol (Batch-Dosis, nominale Konzentration bei  $t_0$  ist 910  $\mu\text{Mol/l}$ ) auf *Escherichia coli* in kohlenstofflimitierter Chemostat-Kultur bei drei Dilution-Raten.

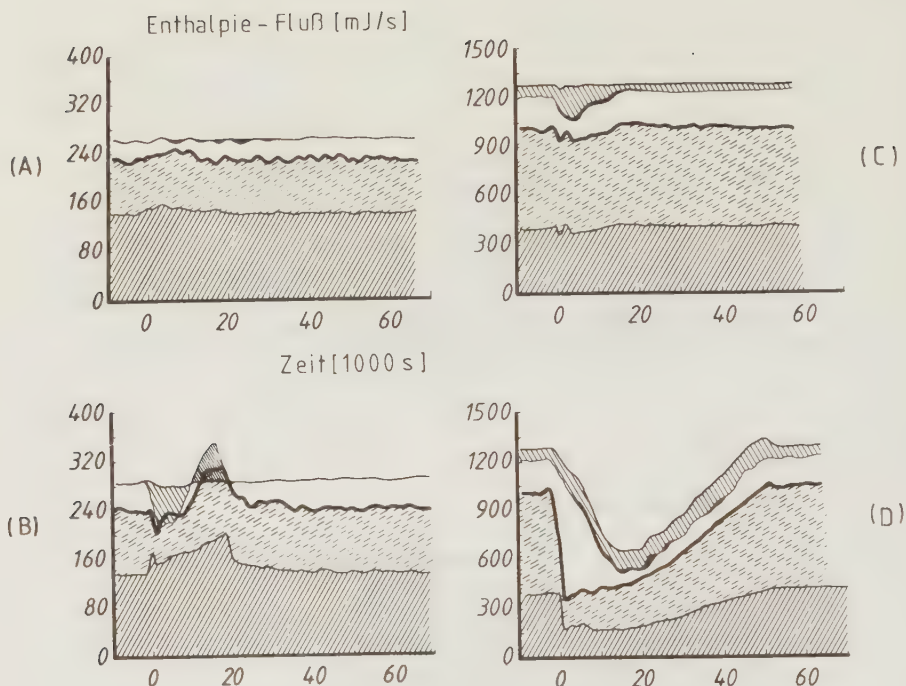


Abbildung 5.14.: Enthalpische Bilanzierung der Wirkung von Phenol gegen *Escherichia coli* in kohlenstofflimitierter Chemostat-Kultur: 3.2 mMol Phenol/l;  $D=0.16/h$  (A). 13.3 mMol Phenol/l;  $D=0.16/h$  (B). 3.2 mMol Phenol/l;  $D=0.75/h$  (C). 13.3 mMol Phenol/l;  $D=0.75/h$  (D).

Die Phenol-Dosierung unter Bedingungen niedriger D-Rate erbrachte erheblich andere Effekte, als eine gleich hohe Dosierung bei hoher D-Rate. In (B) ist die Verschiebung der enthalpischen Bilanz zugunsten von Wärmeproduktion, verbunden mit einer vorübergehenden Ausschüttung von Acetat, das in der Folge als Substrat dient, besonders deutlich. Die Chemostat-Kultur bei hoher D-Rate zeigte immer ein Grundlevel an Acetat, eine Verwertung des Acetats als zusätzliches Substrat wurde bei hoher D-Rate nicht beobachtet.

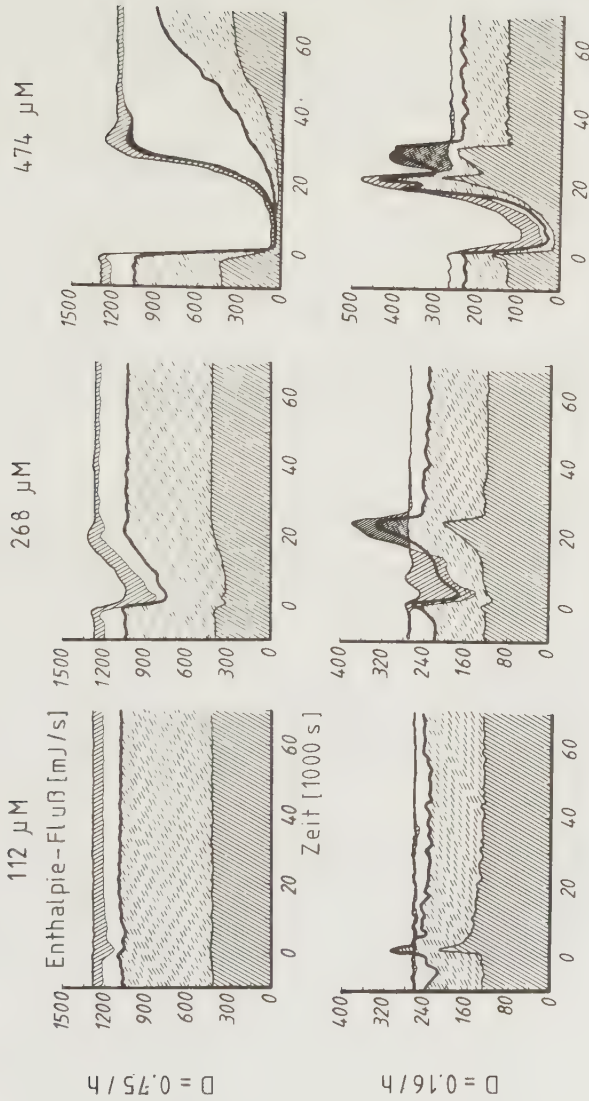


Abbildung 5.15.: Enthalpische Bilanzierungen zur Wirkung von Pentachlorphenol gegen *Escherichia coli* in der Chemostat-Kultur bei  $D$ -Rate=0.75/h (obere Reihe) und  $D$ =0.16/h (untere Reihe). PCP-Nominalkonzentrationen nach der Batch-Dosierung 112  $\mu M$ ; 268  $\mu M$  und 474  $\mu M$  (von links nach rechts).

**Tabelle 5.9.: Arbeitsbedingungen der Long-Term-Toxizitätstests an *Escherichia coli* Chemostaten.**

| D-Rate              | C-limitiert |        | N-limitiert |        |
|---------------------|-------------|--------|-------------|--------|
|                     | 0.43        | l/h    | 0.43        | l/h    |
| Glucose (S)         | 2           | mMol/l | 4           | mMol/l |
| Glucose (So)        | ≈ 0         | mMol/l | ≈ 2         | mMol/l |
| Ammoniumsulfat      | 3.78        | mMol/l | 0.6         | mMol/l |
| Natriumsulfat       | 0           | mMol/l | 3.18        | mMol/l |
|                     |             |        |             |        |
| PCP-Medium          | 35          | µMol/l | 67          | µMol/l |
|                     | 92.5        | µMol/l | 102         | µMol/l |
| Ist-Konzentrationen | 156         | µMol/l | 170         | µMol/l |
|                     | 260         | µMol/l | 279         | µMol/l |
|                     | 356         | µMol/l | 365         | µMol/l |

PCP-Medium wurde im Wechsel mit PCP freiem Medium jeweils für 12 h (5 Verweilzeiten) angeboten. Die PCP-Konzentrationen sind Analysenwerte der Medien nach dem Extraktionsverfahren.

Resultate aus den Langzeitversuchen zeigen die Abbildungen 5.16. (C-limitiert) und 5.17. (N-limitiert), die neben der enthalpischen Stoffflussbilanz auch Detaildaten über den energetischen Yield, die Umsätze an Essigsäure und Ameisensäure und die PCP-Konzentration im Reaktor beinhalten.

Entgegen den Erwartungen aus den Batch-Injektionstests wurden nur minimale Reaktionen der Chemostat-Kultur beobachtet. Die N-limitierte Kultur zeigte keine signifikanten Indikatorreaktionen, ausgenommen kleine Effekte der Wärmestromkurve, und die C-limitierte Kultur lieferte nur mit der intermediären Ausschüttung von Essigsäure bei den beiden höchsten Testkonzentrationen einen Hinweis auf Störungen. Die Wärmestromkurve der C-limitierten Kultur zeigt bereits bei der dritten Testkonzentration einen analytisch signifikanten Effekt, der sich jedoch bei den höheren Testkonzentrationen nicht wesentlich steigerte. Der energetische Yield blieb in beiden Fällen völlig unbeeinflusst, der Beitrag der Ameisensäureausschüttung zur enthalpischen Bilanz war jeweils nicht signifikant.

Die N-limitierte Chemostat-Kultur zeigte im Vergleich zur C-limitierten Kultur einen geringeren energetischen Yield und eine ständige Ausschüttung von Essigsäure, was aufgrund der Überschußsituation für die C-Quelle nicht weiter verwundert.

Die Langzeitstudien deuten aufgrund der geringen Reaktionen in allen Parametern auf eine energetisch für die Bakterienpopulation wenig aufwendige Adaptation an die Gegenwart von PCP hin, die unter den gewählten Testbedingungen über mehrere Verweilzeiten ablaufen konnte.

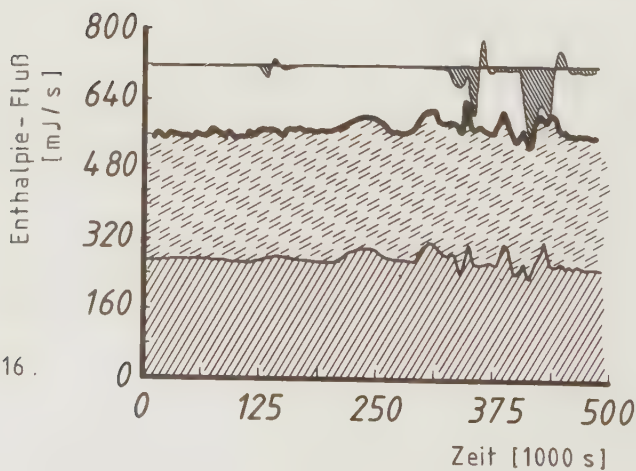
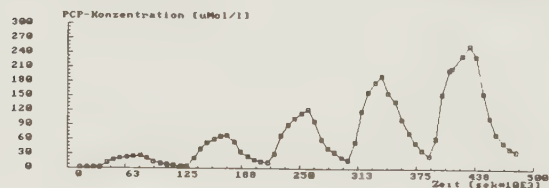
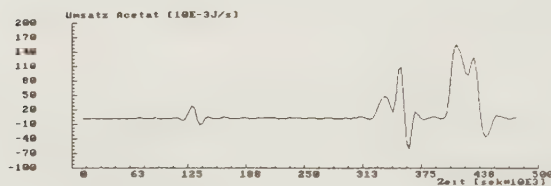
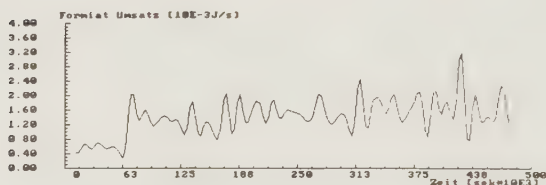
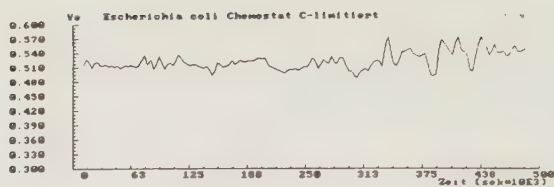
---

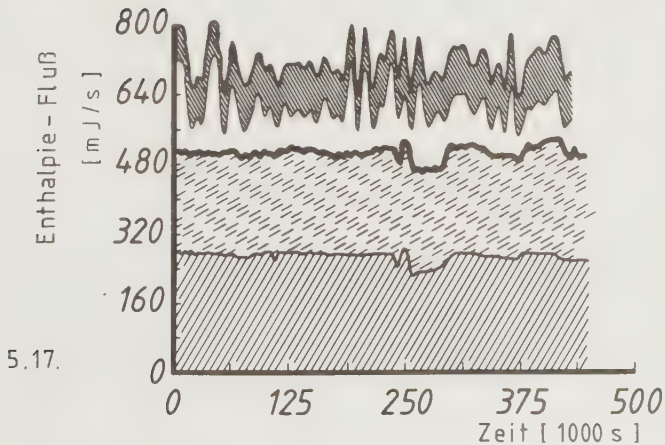
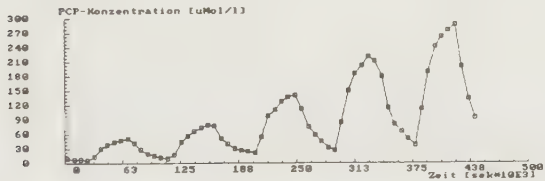
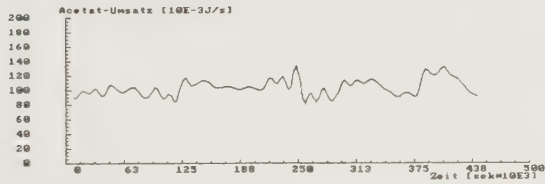
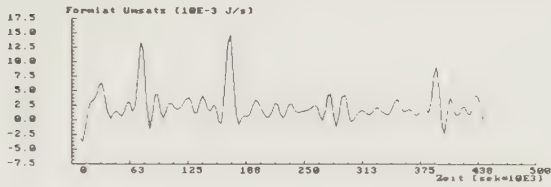
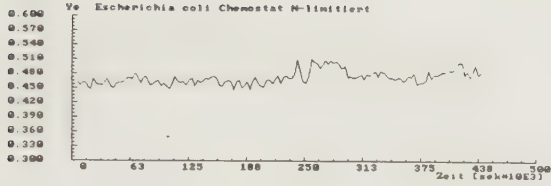
**Abbildung 5.16.: Enthalpische Bilanzierung der Chemostat-Kultur von *Escherichia coli* unter Limitierung durch die Kohlenstoff-Quelle (Glucose). Effekte von PCP bei einer Langzeitexposition von jeweils 5 Verweilzeiten mit belastetem und 5 Verweilzeiten mit unbelastetem P&G-Medium bei einer D-Rate von 0.43/h.**

Die Abbildung enthält als Auszugsdiagramme die PCP-Konzentration im Reaktor, die enthalpisch ausgedruckten Umsätze an Acetat und Formiat (positiv:Produkt; negativ:Substrat) und den energetischen Yield als sensitiven Parameter. Im Vergleich zu Batch-Tests bei gleichen PCP-Konzentrationen treten kaum signifikante Effekte zum Vorschein. Zur Interpretation der Diagramme vgl. Abb. 5.13.

**Abbildung 5.17.: Wie Abbildung 5.16. jedoch Chemostat unter Limitierung durch die Stickstoff-Quelle.**

Im Gegensatz zur C-limitierten Chemostat-Kultur zeigte die N-limitierte eine abweichende Kohlenstoff-ökonomie mit der permanenten Ausschüttung von Acetat und einem niedrigeren energetischen Yield. Wirkungen des Teststoffes PCP traten kaum signifikant in Erscheinung.





### 5.3.3. Zusammenfassung der kalorimetrischen Resultate

Die kalorimetrische Überwachung einer Chemostatkultur oder anderer mikrobieller Systeme (in dieser Arbeit nicht berücksichtigt) erlaubte eine einfache Einschätzung toxischer Effekte der ausgewählten Modellchemikalien anhand eines graphischen Verfahrens (Weppen und Schuller, 1984). Die Langzeitstabilität und Reproduzierbarkeit der Steady-State-Ausgangsbedingungen der Chemostatkulturen gewährleistete ein hohes Signifikanzniveau für das Erkennen physiologischer Wirkungen der Teststoffe.

Unter Einbeziehung von Biomasseanalysen eröffnete der energetische Yield eine vereinheitlichende Beschreibung von Effekten gegenüber der thermochemischen Effizienz des bakteriellen Metabolismus (Schuller und Weppen, 1983).

Die Erweiterung der Parameterzahl um Analysen der mikrobiellen Substrate und Produkte eröffnete die Möglichkeit, Stoffflußbilanzierungen im enthalpischen Maßstab zu erstellen (Weppen, 1985), die jedoch aufgrund der unübersehbaren Fülle mikrobieller Stoffwechselprodukte unvollständig bleiben mußten. Die Stoffflußbilanzierungen ermöglichten einen Einblick in die Beziehung zwischen Reaktionsdynamik der Chemostatkultur und ihren Betriebsbedingungen, die im wesentlichen durch die D-Rate definiert wurden.

Essigsäure trat als metabolisches Produkt wie als Substrat regelmäßig in Erscheinung. Dieser Stoffwechselweg war aber nicht spezifisch für Intoxikationen, sondern arbeitete auch nach Glucose-Injektionen (Weppen, 1985) oder bei hohen D-Raten.

Ameisensäure trat bei hohen D-Raten vereinzelt als Produkt auf, erreichte aber kaum signifikante Anteile an der enthalpischen Stoffbilanz oder an der Kohlenstoffbilanzierung.

Glucose als limitierendes Kohlenstoffs substrat wurde immer nahezu vollständig metabolisiert und erschien als Überschubsubstrat nur bei hohen Teststoffdosierungen und hohen D-Raten in größeren Konzentrationen.

Der Vergleich von Batch-Intoxikationen (Unfallsimulation) und Langzeitbelastungen deutete auf die Fähigkeit der Adaptation der Chemostat-Kultur gegenüber PCP hin, wobei der Konzentrationsbereich oberhalb der IC-50 aus den Batch-Injektionen nicht bearbeitet wurde.

#### 5.4. Verbleib der Teststoffe

Die Teststoffe wurden in den kalorimetrischen Versuchen als einmalige Gaben konzentrierter Lösungen dem Kulturmedium der Chemostatkultur zugesetzt. Damit sollte eine schlagartige Konzentrationsänderung im Bioreaktor mit einer anschließenden Auswaschung mit der üblichen Verweilzeitcharakteristik des Chemostaten folgen. Diese Annahmen sind zunächst unabhängig von der Natur der Teststoffe.

Im Gegensatz zu diesem Testverfahren wurde in den Langzeitversuchen mit PCP ein PCP-haltiges Kulturmedium verwendet, so daß nach Umstellung auf belastetes Medium ein asymptotischer Anstieg zur Nominalkonzentration nach Gl. 5.14. folgte. Beim anschließenden Wechsel auf unbelastetes Medium fand sich eine Auswaschung der Teststoffkonzentration nach der Verdünnungsgleichung des Chemostaten Gl. 5.15. (Tempest, 1970).

$$\frac{P_t}{P} = 1 - e^{-Dt} \quad (\text{Gl. 5.14.})$$

$$\frac{P_t}{P_o} = e^{-Dt} \quad (\text{Gl. 5.15.})$$

Darin ist P die Teststoffkonzentration im Mediumreservoir,  $P_t$  die Konzentration im Reaktor zur Zeit t und  $P_o$  die Teststoffkonzentration im Reaktor zum Zeitpunkt  $t_o$ , was dem Beginn der Auswaschphase entspricht. Im Falle der Batch-Intoxikation mit einer momentanen Teststoffgabe sollte Gl. 5.15. den Konzentrationsverlauf hinreichend beschreiben, sofern keine schwerwiegenden systematischen Fehler auftreten, wie abweichendes Zeitverhalten des Reaktors oder Teststoffverluste auf anderen Wegen.

##### 5.4.1. Die organischen Teststoffe

Für die kalorimetrisch ausgetesteten organischen Komponenten war nur ein recht grobes analytisches Instrumentarium mit der extraktiven spektrophotometrischen Analytik für PCP und 2-Nitrophenol und dem 4-Nitroanilin-Verfahren für Phenol verfügbar. Die Verfahren sind nicht übermäßig spezifisch für die einzelnen Substanzen und erfordern recht große Absolutmengen

an Substanz für die einzelne Analyse. Aus diesen Gründen waren die Methoden ungeeignet zur Bestimmung der Stoffe in ganzen Zellen, und es erfolgte notwendigerweise eine Beschränkung auf die analytische Kontrolle der Gelöst-Anteile der Modellchemikalien im mikrobiellen Testsystem. Abbildung 5.18. gibt Beispiele für die analytisch ermittelten Konzentrationsprofile der Teststoffe im Batch-Injektionsverfahren.

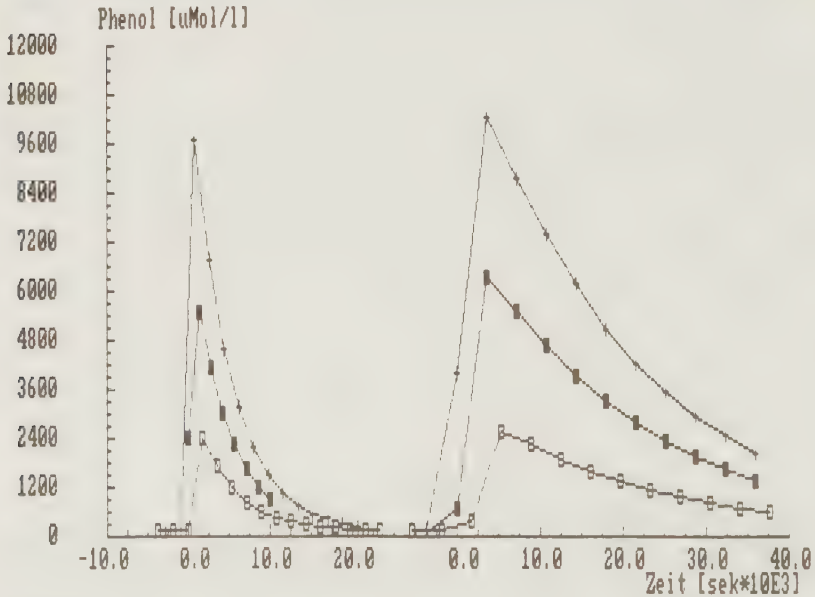
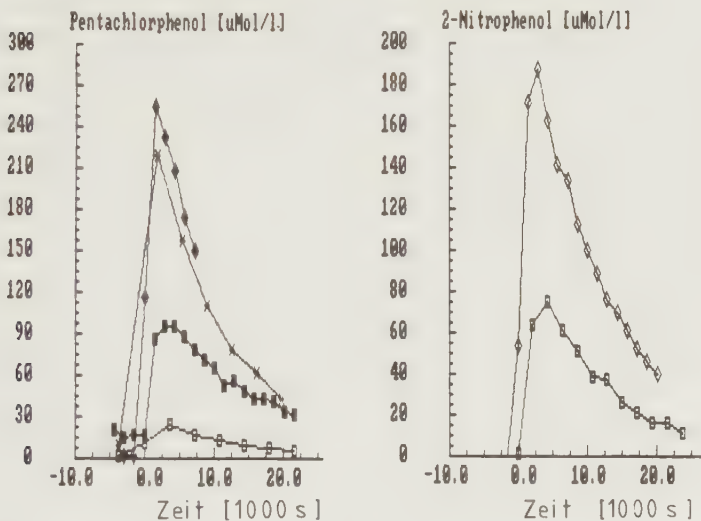


Abbildung 5.18A.: Verbleib der organischen Teststoffe im kalorimetrischen System nach Batch-Injektion.

Links Phenol bei  $D=0.16/h$  und rechts bei  $D=0.75/h$ . Konzentrationen  $\square$   $3.18 \text{ mMol/l}$ ;  $\blacksquare$   $7.57 \text{ mMol/l}$ ; und  $\times$   $13.4 \text{ mMol/l}$ . Die Verdünnungsfunktion entsprach der exponentiellen Abklingkurve (siehe Text) mit einem Faktor im Exponenten, der von der eingestellten D-Rate nur geringfügig abwich. Die Wiederfindung bezogen auf den Zugabezeitpunkt lag zwischen 75 und 90%.

Phenol und Pentachlorphenol zeigten bei allen Testkonzentrationen zwischen 75 und 90 Prozent der Nominalkonzentration, wenn die Verdünnungsfunktionen auf den Zeitpunkt der Teststoffgabe extrapoliert wurden (leicht ausführbar als lineare Näherung, wenn die Teststoffkonzentrationen logarithmisch

gegen die Zeit aufgetragen werden). Damit ist es meines Erachtens valide, die biologischen Reaktionen auf die errechneten Nominalkonzentrationen zu beziehen.



**Abbildung 5.18B.: Verbleib der Teststoffe Pentachlorphenol und 2-Nitrophenol im Kalorimetersystem. Beispiele bei  $D=0.43/h$ . PCP (links):  $\square$  47  $\mu\text{Mol/l}$ ;  $\blacksquare$  200  $\mu\text{Mol/l}$ ;  $*$  356  $\mu\text{Mol/l}$ ;  $\diamond$  475  $\mu\text{Mol/l}$ ; jeweils Nominalkonzentration bei  $t=0$ . 2-Nitrophenol (rechts):  $\square$  385  $\mu\text{Mol/l}$ ;  $\diamond$  683  $\mu\text{Mol/l}$ . Die Wiederfindungsrate von PCP betrug zwischen 75 und 90%. 2-Nitrophenol wurde nur zu etwa 30% der Nominalkonzentration wiedergefunden.**

Die Komponente 2-Nitrophenol lieferte bei Anwendung des beschriebenen Extrapolationsverfahrens nur Wiederfindungen von etwa 30%. Die Kontrollversuche zum Verbleib der Teststoffe in Abschnitt 5.1.4. lieferten hierfür keine ausreichende Erklärung, so daß Artefakte aus der Probenahme oder Probenaufarbeitung ebenso wenig ausgeschlossen werden können, wie chemische Umsetzungen.

Die Konzentrationsverläufe der drei Komponenten zeigten ein Zeitverhalten nach Gl. 5.15, wobei die experimentell ermittelte Konstante im Exponenten um etwa  $\pm 10\%$  von der eingestellten Dilution-Rate abwich.

#### 5.4.2. Das Quecksilber

Es wurde bereits zu Beginn von Kap. 5 darauf hingewiesen, daß kalorimetrische Untersuchungen mit  $\text{HgCl}_2$  nicht weiter berücksichtigt werden sollten, da nur geringe Wiederfindungen aufgrund chemischer Wechselwirkungen mit Apparaturbestandteilen auftraten. Der erste Hinweis auf diese Probleme mit Quecksilber ergab sich aus einer analytischen Aufarbeitung eines Versuches mit einer Hg-II Nominalkonzentration von  $1050 \mu\text{g/l}$ . Die analytischen Daten dieses Versuches umfaßten die Bestimmung des freien, reduzierbaren Quecksilbers, d.h. des Hg-Anteiles in der Probe, der in saurer Lösung mit Zinn-II-chlorid reduzierbar ist, der Quecksilberkonzentration im zellfreien Probengut nach Permanganat-Aufschluß und der Gesamtkonzentration in der Zellsuspension nach Permanganat-Aufschluß. Die Resultate sind in Abb. 5.19. zusammengestellt. Neben einer Total-Wiederfindung von etwa 40% (extrapoliert auf Zugabezeitpunkt) findet sich eine Gelöst-Konzentration von etwa 30% der wiedergefundenen Gesamt-Hg-Konzentration, wovon nur etwa 1% frei reduzierbar vorlagen. Dieses Ergebnis zeigt, wie komplex metalltoxikologische Versuchsansätze allein von Seiten der Teststoffdarbietung sind. Das Vorliegen einer **Spurenfraktion** an frei reduzierbarem Hg deutet auf massive Änderungen der chemischen Speciation des Quecksilbers hin. Die gemessene Verteilung des Quecksilbers zwischen gelöster und partikulärer Phase belegt ein hohes Akkumulationsvermögen der Zellen für Hg.

Die umrissenen Ergebnisse veranlaßten mich, eine umfassende Untersuchung zur Einstellung von Konzentrationsgleichgewichten für Quecksilber zwischen *Escherichia coli* Zellen und Kulturmedium anzustellen, die jedoch hier nur mit einem Musterbeispiel präsentiert werden soll, um den Rahmen der Arbeit nicht zu sehr aufzuweiten. Abbildung 5.20. zeigt den zeitlichen Verlauf der Quecksilber-Konzentrationen in einem Batch-Testansatz mit exponentiell wachsenden *Escherichia coli* Zellen in Gegenwart einer Anfangskonzentration von  $73 \mu\text{g Hg-II}$ . Aufgetragen wurden Totalkonzentrationen sowie Gelöst-Konzentrationen und die Zellkonzentration als Funktion der Zeit im R&G-Vorkulturmedium.

Das Beispiel, es steht hier nur stellvertretend für eine systematische Untersuchungsserie, belegt die zeitabhängige Einstellung einer Verteilung von Hg zwischen Zellen und Kulturmedium und liefert einen Hinweis auf weitere Wechselwirkungen, die sich mit dem Eintreten eines erheblichen Schwundes an Hg nach längerer Kontaktzeit einstellen. Eine Vertiefung muß aus Platzgründen hier jedoch unterbleiben.

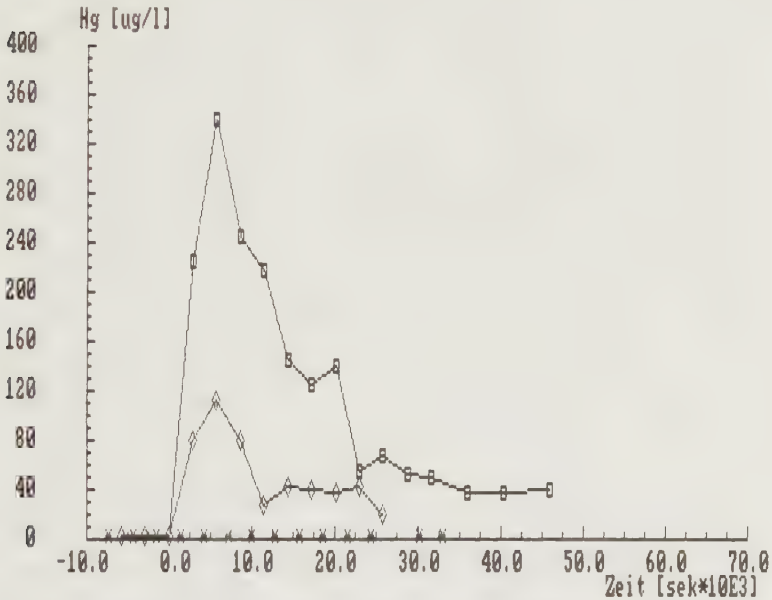


Abbildung 5.19.: Der Verbleib von Quecksilber im kalorimetrischen Testsystem. Die Zugabe von Quecksilber-II-Chlorid zu einer Nominalkonzentration von 1050 µg Hg/l erbrachte eine analytische Wiederfindung von etwa 40% (Gesamt-Hg; □), wovon wiederum nur 30% in geloster Form vorlagen (◇). An freiem reduzierbarem Quecksilber (\*) waren nur Spuren nachweisbar (siehe Text).

Biotrockenmasse [mg / l]

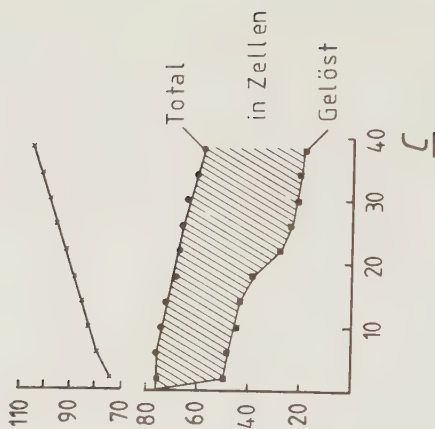
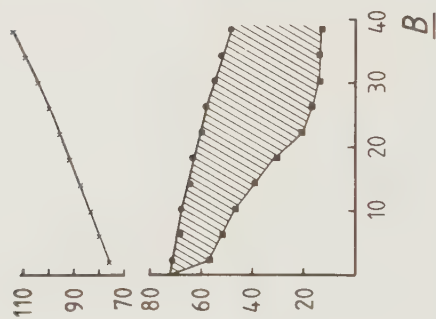
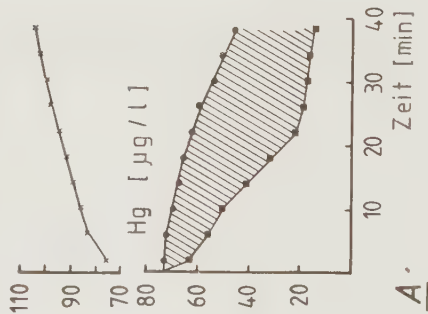


Abbildung 5.20.: Verbleib von Quecksilber unter kontrollierten Batch-Kulturbedingungen in einer Ganzglas-Apparatur. Anfangskonzentration bei to war 73 µg Hg-11. Eine zeitabhängige Einstellung einer Verteilung zwischen Biomasse (schraffierte Fläche) und Gelöst-Hg aus dem Testsystem. ebenso, wie ein Verlust an Gesamt-Hg aus dem Testsystem. Mg-Ionen gelten als Antagonisten, ihre Konzentration wurde variiert (0.405 mM (A); 4.05 mM (B); 40 mM (C)). Es zeigten sich gewisse Unterschiede zwischen den Testreihen, insbesondere die erste schnelle Hg-Bindung nahm mit steigendem Mg-Gehalt zu, es soll aber darauf verzichtet werden, diese Wechselwirkungen hier näher zu analysieren.

## 6. Diskussion

Nachdem im Experimentaltteil eine breite Palette von Resultaten toxikologisch orientierter Untersuchungen an den chemoorganotrophen Bakterien *Escherichia coli* (Enterobacteriaceae) und *Acinetobacter calcoaceticus* vorgestellt wurde, die vornehmlich auf wachstumsdynamische und energetische Effekte ausgerichtet war, gilt es nun, zu einem vereinheitlichenden Interpretationsansatz zu gelangen, der eine differenzierende Modellbildung zum gesamtheitlichen energetischen Effekt an den Modellorganismen ermöglicht. Gerade die Chemostatkultur, als physiologisches Modell sicherlich nicht der einfachste denkbare Ansatz, verfügt nach Malek (1976) über den Vorzug, daß kontrollierte und manipulierbare physiologische Zustände einer Mikroorganismenpopulation über lange Zeiträume herstellbar sind, was mit üblichen Batch-Kulturtechniken nur sehr begrenzt zu verwirklichen ist. Diese besonderen Eigenschaften waren aber gerade der Grund, das Chemostat-Prinzip anzuwenden. Eine Modellbildung muß deshalb auf die besonderen Bedingungen der Chemostatkultur Rücksicht nehmen. In den folgenden Abschnitten wird das mikrobielle System zunächst aus der Sicht von Makroparametern, worunter ich die Stoff- und Energieflüsse verstehen will, dann aus detaillierter mechanistischer und morphologischer Sicht betrachtet, worunter die Zellstruktur und die Vernetzung katabolischer und anabolischer Reaktionen verstanden werden soll. In einem zweiten Hauptabschnitt werden physiologische und physikalisch chemische Grundlagen und Modelle der Wechselwirkungen zwischen den Teststoffen und den Mikroorganismen als sehr spezielles Target behandelt. Den Abschluß bildet ein Modellierungsvorschlag, der jedoch nicht als Rechenmodell verstanden werden soll, sondern vielmehr als Denkmodell, um die Möglichkeiten und Grenzen des vorgeschlagenen Systems als toxikologisches Instrument zu verstehen.

### 6.1. Elemente eines Modells für die Organismen

#### 6.1.1. Wachstumskinetik und -Dynamik als grundlegende Elemente einer Modellvorstellung der toxischen Effekte von Umweltchemikalien gegenüber mikrobiellen Populationen

Wenn wachstumskinetische Betrachtungen an Mikroorganismen, im engeren Sinne solchen mit binärem Teilungszyklus, angestellt werden, so kann als elementare Basis der Monod-Formalismus (Monod, 1942; Monod, 1950) nicht übergangen werden, da er zumeist ausreicht, um mikrobielles Wachstum in der Batch- oder Chemostat-Kultur zu beschreiben.

Die enge Übereinstimmung des Monod-Formalismus mit der Michaelis-Menten-Kinetik, die in der Biochemie zur Beschreibung einfacher Enzymkinetiken herangezogen wird, verdeutlicht, daß das zugrundeliegende Denkmodell des Monod-Ansatzes eine Mikroorganismenpopulation ist, deren Stoffwechselvorgänge sich in einem Fließgleichgewicht befinden, so daß keine zeitlichen Änderungen der Konzentrationen intermediärer Stoffe auftreten. Wird nun angenommen, daß eine biochemische Reaktion, die selbst nach dem Michaelis-Menten-Ansatz beschreibbar ist, den geschwindigkeitsbestimmenden **Flaschenhals** bildet, so ist eine modellhafte Beschreibung der bakteriellen Wachstumskinetik nach Monod ausreichend und kann nach den Gleichungen 6.1. bis 6.4. erfolgen.

$$v = v_{\max} \frac{S_1}{K_s + S_1} \quad (\text{Gl. 6. 1.})$$

$$\frac{dS}{dt} = -X \frac{v_{\max} \cdot S_1}{K_s + S_1} \quad (\text{Gl. 6. 2.})$$

$$\frac{dX}{dt} = -Y \frac{dS}{dt} \quad (\text{Gl. 6. 3.})$$

$$Y = \text{konst.} \quad (\text{Gl. 6. 4.})$$

$$\frac{1}{Y} = \frac{m}{\mu} + \frac{1}{Y_{tr}} \quad (\text{Gl. 6. 5.})$$

Mit Abbildung 6.1. wurde von mir ein Versuch unternommen, die Situation zu illustrieren. Eine vollständige Herleitung unter Berücksichtigung der Massenbilanzen des Chemostaten (vergl. Kap. 5) findet sich bei Herbert, Elsworth und Telling (1956) oder Tempest (1970) und kann als bekannt vorausgesetzt werden.

Neuere Untersuchungen an Chemostaten belegen, daß die Annahme eines konstanten Yield-Koeffizienten nicht haltbar und durch ein besseres Modell zu ersetzen ist (Pirt, 1966). Der Ertragskoeffizient für das Kohlenstoffs substrat steigt mit der spezifischen Wachstumsrate an, wie meine Daten in Kap. 5 ebenfalls zeigen. Pirt führt eine Erweiterung des Yield-Begriffes um einen **Maintenance-Energy-Term** ein und gibt die Gleichung 6.5.

als Beschreibung des tatsächlichen Yields in Abhängigkeit von der Dilution-Rate einer Chemostat-Kultur. Die Betrachtungen haben, wie die vorangehenden, nur unter steady-state-Bedingungen Gültigkeit.

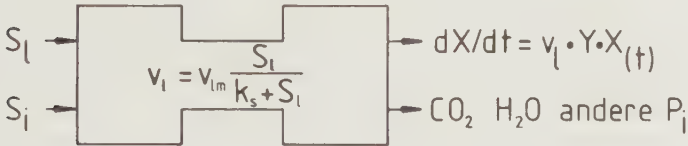


Abbildung 6.1.: Die Wachstumskinetik einer Bakterienkultur in der Chemostat-Kultur nach dem Konzept von Monod.

Die Wachstumsgeschwindigkeit wird mit einer enzymkinetischen Gleichung (Michaelis-Menten-Typ) beschrieben. Der Stöchiometriefaktor für die Biosynthese, der Yield ( $Y$ ) des betrachteten Substrates, ist konstant.

Das Maintenance-Energy-Konzept, es dient der quantitativen Beschreibung des Energieaufwandes der Zelle für die Erhaltung ihrer strukturellen Integrität, wird von Pirt (1982) nochmals mit einem weiteren Term modifiziert. Die Probleme einer statistischen Absicherung der Maintenance-Energy-Rate, die bei Fieschko und Humphrey (1984) dargelegt sind, lassen es jedoch ratsam erscheinen, auf dieses erweiterte Konzept zu verzichten. Eine Auswertung eigener Daten nach dem Konzept von Pirt (1966) ergab Maintenance-Energy-Raten von  $13.05 \cdot 10^{-6} \text{ J}/(\text{J BTM} \cdot \text{sek})$  bei einem wahren Yield von 0.65 für *Acinetobacter calcoaceticus* und  $25.5 \cdot 10^{-6} \text{ J}/(\text{J BTM} \cdot \text{sek})$  bei einem wahren Yield von 0.635 für *Escherichia coli* unter Zugrundelegung des in Kap. 5 definierten energetischen Yields (Weppen, 1985; Weppen und Schuller, 1984b) anstelle der massenbezogenen Yield-Definitionen bei Pirt (1966). Mit Abbildung 6.2. möchte ich die graphische Illustration dieses erweiterten Konzeptes anbieten.

Die Betrachtungen zur mikrobiellen Wachstumskinetik müssen wesentlich erweitert werden, wenn dynamische Änderungen ins Feld rücken und die idealisierende Annahme der Fließgleichgewichtssituation nicht mehr gilt. Den einfachsten Fall derartiger Dynamik stellt die momentane Zugabe von zusätzlichem Substrat zur kohlenstofflimitierten Chemostat-Kultur dar (Weppen, 1985), die ich hier kurz beleuchten möchte.

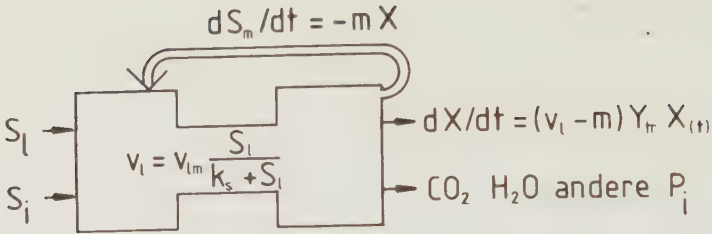


Abbildung 6.2.: Das Monod'sche Konzept wird von Pirt (1966) um einen wachstumsratenabhängigen Yield-Koeffizienten erweitert.

Meine Darstellung deutet an, daß unter Substratmangel eine Aufzehrung der Biomasse durch die Maintenance-Energy erfolgen kann, was als endogene Atmung wohlbekannt ist.

Abbildung 6.3. gibt das Beispiel der zusätzlichen Gabe von Glucose (7.2 mMol/l) als einmalige Batch-Dosierung zur Chemo-stat-Kultur. Mit zunehmender Dilution-Rate nimmt die Reaktivität des mikrobiellen System sichtlich ab, was anhand der Auftragung der ersten Ableitung des Logarithmus der Warmestrom-Zeit-Kurve besonders deutlich wird, da diese Auftragung die spezifische Zuwachsrates der Wärmeproduktion als Funktion der Zeit zeigt.

Grenzen der dynamischen Reaktivität einer Bakterienpopulation lassen sich nach Literaturlage damit begründen, daß die Population zum jeweiligen physiologischen Zustand unter steady-state Bedingungen eine optimal äquilibrierte Konzentration der notwendigen Enzymaktivitäten aufweist, die sich nicht ohne physiologische Übergangsphasen an geänderte Bedingungen anpassen kann. So findet sich bei Herbert (1976) die Abhängigkeit der RNA-Konzentrationen von der Wachstumsrate, die sich als direktes Maß für translatierbare Geninformation auslegen läßt (Gottschalk, 1985).

Chase (1977) bietet ein dynamisches Modellierungskonzept an, das ausgehend von dem Konzept äquilibrierter biochemischer Aktivitäten mit zeitabhängigen Zuwachs- Abnahmeprozessen dieser zustandsspezifischen intrazellulären Bedingungen zu einer hinreichenden Beschreibung der Reaktivität von Belebtschlamm gegen Substratschockbelastungen führt. Modellrechnungen mit diesem Ansatz unter starker Vereinfachung erbrachten Experimenten an *Acinetobacter* (Weppen, 1984 unveröffentlicht).

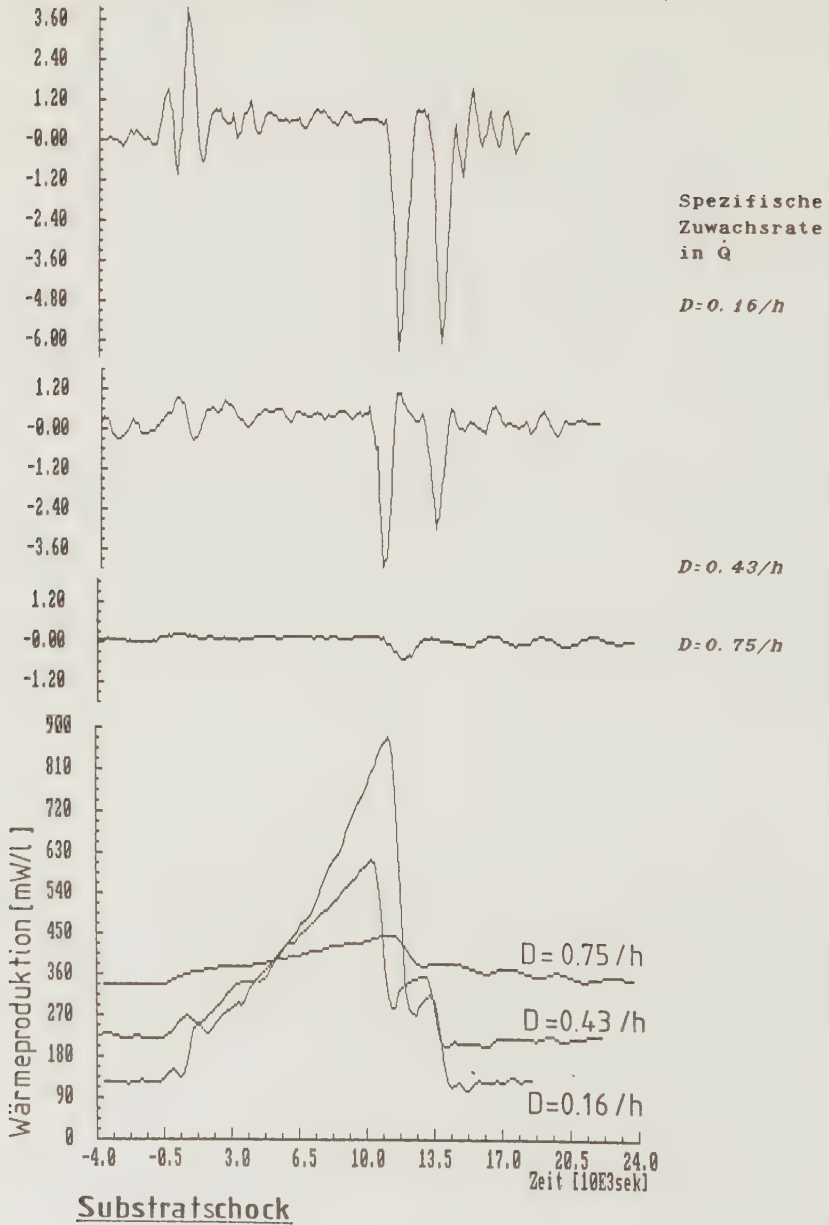
Daigger und Grady (1982) entwickeln in einer Review-Arbeit ein Modell für die Reaktivität mikrobieller Populationen und führen die Begriffe Wachstumsraten-Hysterese (Growth-Rate-Hysteresis; GRH) und verfügbares Reaktionspotential (Available-Reaction-Potential; ARP) ein. Die zugehörige Modellierung sieht die Zelle nicht mehr mit den Augen des Monod'schen Flaschenhalsprinzips, sondern als Netzwerk von biochemischen Reaktions-einheiten, die über intermediäre Pools miteinander verkettet sind und jeder für sich mit den hinlänglich bekannten enzym-kinetischen Gleichungen beschrieben werden. Leider, und das verhindert die Übertragbarkeit auf die vorliegende Arbeit, stützt sich das Konzept von Daigger und Grady nahezu ausnahmslos auf die Verkettung **anabolischer** Reaktionen, die jedoch gerade mit meinem methodischen Ansatz überhaupt nicht direkt zugänglich sind. Die Autoren begründen dies mit den unklaren und komplexen stöchiometrischen Bedingungen der energetisch gekoppelten Reaktionen des **Katabolismus**, worauf ich gesondert eingehen möchte.

Betrachtet man jüngere Arbeiten zum Wachstum von Mikroorganismen auf ihren Substraten, so finden sich selbst für steady-state Geschwindigkeitsgleichungen Ansätze, die stark vom Monod-Formalismus abweichen, wie bei Button (1985) mit verschiedenen Formulierungen gezeigt wird. Eine interessante Annäherung zwischen der in der Mikrobiologie gebräuchlichen Geschwindigkeitsgleichung von Monod und der in der ökologie üblichen logistischen Gleichung bieten Qiwu et al (1984), womit m.E. auch ein Trend zur Anerkennung der Populationsforschung an Mikroorganismen als ökologisches Instrumentarium gesehen werden kann.

---

**Abbildung 6.3.: Beispiele für die Reaktionsdynamik einer Chemostat-Kultur von *Escherichia coli* unter Limitierung der Kohlenstoffquelle (Glucose). Zusatzgaben von Glucose zu einer Konzentration von 7.2 mMol/l im Zugabemoment bewirkten eine Zunahme der Wärmeproduktion durch die Steigerung der Stoffwechselaktivität. Mit größeren Dilution-Raten nahm dieser Zuwachseffekt ab, was anhand der spezifischen Zuwachsrates der Wärmestromkurven besonders deutlich wird.**

Abbildung 6.3.: *Escherichia coli* + 7.2 mMol Glucose/l bei  $t_0$



Eine Modellbildung für mikrobielle Populationen unter Bedingungen erzwungener Änderungen des physiologischen Zustandes, wie eben des Einwirkens von Noxen, macht nach Lage der Literatur eine Auffassung der Mikroorganismenzelle als mehrfach kompartimentiertes, interaktives Netzwerk erforderlich, wie von Daigler und Grady (1982) vorgeschlagen wird. Die Formulierung der Geschwindigkeitsgleichungen der Modellkompartimente kann verschiedenartig erfolgen, abhängig davon, welchem Ansatz gefolgt werden soll. Button (1985) diskutiert sehr verschiedene Ansätze allein schon für Transportphänomene und spezifische Wachstumsraten.

#### **6.1.2. Bioenergetik der Bakterienzelle - Energy-Charge und ATP-Pool**

Wohl kaum ein Gebiet der Biochemie hat in den letzten Jahren einen derartig fundamentalen Wandel der Grundsatzauffassungen erlebt, wie die Bioenergetik seit der fundamentalen Arbeit von Mitchell (1966) zur chemiosmotischen Kopplung biochemischer Reaktionen der oxidativen und photosynthetischen Phosphorylierung.

Unter aeroben Lebensbedingungen erzeugen die heterotrophen Organismen den überwiegenden Teil ihres ATP-Bedarfes nicht durch Substratkettenphosphorylierung, die wir z.B. in der Glycolyse antreffen, sondern mit Hilfe der oxidativen Phosphorylierung, die an der Zellmembran unter Ausnutzung eines durch vektoriell orientierte biochemische Reaktionen generierten Membranpotentials und eines pH-Gradienten abläuft. Der Aufbau dieser **Energetisierung** der Zellmembran ist ein Resultat der Oxidation von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  mit Sauerstoff über ein membran gebundenes Elektronentransportsystem. An anderer Stelle der Membran koppeln ATPasen (eine umfangreiche Gruppe von membran gebundenen mechanochemischen Enzymen) den Durchtritt von Ionen durch die Membran an die Bildung oder Spaltung von ATP. Der Stöchiometriefaktor dieser Phosphorylierung ist, im Gegensatz zu früheren Annahmen, variabel und erfordert den Einstrom von 2 bis 4  $\text{H}^+$  in die Zelle pro energiereiche Phosphatbindung (Gottschalk, 1985).

Eine wichtige Voraussetzung für den Ablauf dieser Reaktionskette ist die Impermeabilität der Zellmembran für die beteiligten Ionen. Nach van Dam und Mulder (1984) verfügt die Bakterienzelle über regulative Mechanismen, die den katabolischen Stoffumsatz, den Umsatz von Reduktionsäquivalenten und den Energiebedarf in der zellulären **Universalwährung** ATP

balancieren. Dem ATP-Pool kommt danach die Rolle des Kopplers zwischen Katabolismus und Anabolismus mindestens aus thermodynamischer Sicht zu. Hochgradig geregelte physikalisch-chemische Bedingungen, wie eine Homeostasis des zellinternen pH von 7.6 bis pH 7.8 für *Escherichia coli* (Zilberstein et al, 1984), sind Bestandteil der Regelmechanismen von Bakterienzellen und erfordern die Beteiligung von spezifischen Ionenpumpen (Booth, 1985).

Da hier nicht die moderne Bioenergetik aufgearbeitet werden soll, sondern lediglich Aspekte für die Modellbildung zum mikrobiellen Testsystem erarbeitet werden sollen, möchte ich die wesentlichen Ansätze aus energetischer Sicht kurz zusammenfassen:

- der ATP-Pool der Zelle besitzt eine Mittlerrolle zwischen Katabolismus und Anabolismus und kontrolliert regulativ verschiedene katabolische Reaktionswege (Gottschalk, 1985).
- Der Adenylate-Energy-Charge (AEC), definiert als Verhältnis von  $ATP + 1/2 ADP$  zu  $ATP + ADP + AMP$  (Wiebe und Bankroft, 1975), steht in enger Beziehung zum physiologischen Zustand der Zelle. Ein AEC von 0.8 bis 0.95 findet sich in wachsenden Zellen, stationäre Zellen zeigen einen AEC von 0.6 und absterbende Zellen weniger als 0.5
- ATP wird auf zwei grundsätzlich verschiedenen Wegen generiert, als Substratkettenphosphorylierung mit definierter Stöchiometrie und auf dem Wege der chemiosmotischen Kopplung mit variabler Stöchiometrie.
- Die homeostatische Regelung des zellinternen pH steht nach Booth (1985) in enger Beziehung zur Wachstumsfähigkeit von *Escherichia coli*. Bei einem internen pH-Wert unterhalb von pH 7.2 verliert *Escherichia coli* die Wachstumsfähigkeit.
- Die Funktionsfähigkeit der Zellmembran als physikalische Barriere (Impermeabilität für Ionen) ist unabdingbare Voraussetzung für die oxidative Phosphorylierung.

Auf keinen der genannten Parameter bietet die Kalorimetrie einen direkten Zugriff, wenngleich die Ermittlung eines verminderten energetischen Yields deutliche Hinweise auf eine Verschlechterung der Kopplung von Katabolismus und Anabolismus über den ATP-Pool aufzeigt und die Ausschüttung von Acetat auf alternative Wege der ATP-Gewinnung über Substratketten-Phosphorylierung hinweist (siehe Abb. 6.4).

Eine Modellierung, mit dem Schwerpunkt Kalorischer Effizienz, muß mindestens einen Ansatz für die Substratkettenphosphorylierung und den Wirkungsgrad der oxidativen Phosphorylierung enthalten. Ein Pool von ATP als Bindeglied zwischen Katabolismus und Anabolismus kann Bestandteil einer Modellierung des anabolischen Systemteiles sein.

### 6.1.3. Acetat als Intermediärstoff von *Escherichia coli*

Acetat kann im Metabolismus von *Escherichia coli* sowohl als Produkt wie auch als Substrat auftreten; beide Wege finden sich in den eigenen Experimenten regelmäßig. Die Ausschüttung von Acetat tritt nicht als ursächliche Folge toxischer Wirkungen sondern offensichtlich als Resultat biochemischer Ungleichgewichtsbedingungen auf, worauf die steady-state Ausschüttung bei hohen D-Raten hinweist, die aus der Literatur bekannt ist (Ishikawa und Shoda, 1983). Diese Autoren weisen auch auf weitere unidentifizierte Komponenten in der Chemostatkultur hin, was in guter Übereinstimmung mit meinen enthalpischen Bilanzen ist, die ebenfalls signifikante Fehlbeiträge aufweisen. In der Batch-Kultur oder nach Zugabe von zusätzlichen Dosierungen von Glucose bildet *Escherichia coli* ebenfalls Acetat, das als Substrat verwertet wird, wenn die Glucose verbraucht ist und einen zweiten Peak in der Wärme-strom-Kurve hervorruft (vgl. Abb. 6.3.). Auch diese Beobachtung ist in guter Übereinstimmung mit der Literatur (Ishikawa et al, 1981).

Betrachtet man eine Auswahl von enzymatischen Reaktionen, die Acetat als Substrat oder Produkt nutzen, so lassen sich verschiedene Begründungen für die Ausschüttung von Acetat angeben.

Die Acetyl-CoA-Synthetase bietet einen effizienten Weg zur Aufnahme von Acetat in den zellulären Kohlenstoff-Pool, da das Produkt Acetyl-CoA in der Zelle universell genutzt wird, dieser Weg dürfte aber stark vom zellulären Energy-Charge und von der Acetat-Konzentration abhängen. Eine Ausscheidung von Acetat muß über andere Wege ablaufen, da das anorganische Pyrophosphat PPI in der Zelle nicht verfügbar ist. Mögliche Wege laufen vom Pyruvat oder vom Acetyl-CoA auf verschiedenen Wegen zum Acetyl-Phosphat und unter ATP-Gewinn an der Acetat-Kinase zum Acetat (Gottschalk, 1985). Die experimentellen Daten lassen einen Schluß auf den enzymatischen Weg im Detail nicht zu. Entscheidend für die Interpretation der Acetat-Ausschüttung scheint mir aber die Einbindung der Reaktionswege in den ATP-Haushalt der Zelle.

#### **6.1.4. Zusammenfassung - energieflußorientierte Modellierung des zellulären Stoffwechsels**

Ein mechanistischer Modellierungsvorschlag, der die vorangehend diskutierten Gesichtspunkte berücksichtigt, wird in Abb. 6.4. visualisiert. Die Schwerpunktsetzung bei den katabolischen Reaktionen ist ein Resultat ihrer Dominanz am enthalpischen Effekt des bakteriellen Wachstums und wird deshalb in diesem Stoff- und Energiefluß orientierten Arbeitsansatz besonders gewürdigt.

Die zentrale Bedeutung des ATP-Pools, in der Abbildung in der Form des Adenylate-Energy-Charge dargestellt, tritt ebenso hervor wie die räumliche Trennung der Atmungskette und der ATPase-Aktivitäten, womit die Bedeutung der intakten Zellmembran für die energetische Effizienz der Zelle deutlich wird. Die Aufnahme von Glucose in die Zelle verläuft ATP-abhängig (Gottschalk, 1985) und besitzt damit für Glucose eine Reaktionsordnung nahe bei 0 und eine sehr hohe Affinität (Button, 1985). Zur Aufrechterhaltung eines konstanten Energy-Charge müssen die ATP-Produktion und Konsumption von der Zelle geregelt werden, was durch Feed-Back-Regelkreise für die Glycolyse, den Tricarbonsäure-Zyklus und anabolische Reaktionen gewährleistet ist (Pelczar und Chan, 1981).

Unter stöchiometrischen Gesichtspunkten liefert die Glycolyse nach dem Embden-Meyerhof-Parnas Weg einen Ertrag von 2 Mol ATP/Mol umgesetzte Glucose. Die Bildung von Acetat an der Acetat-Kinase ergibt 1 Mol ATP pro Mol Acetat. Der Tricarbonsäurezyklus speist zusammen mit dem EMP-Weg Reduktionsäquivalente in die Atmungskette ein. 10 NAD(P)H+H<sup>+</sup> und 2 FADH<sub>2</sub> erbringen maximal einen Ertrag von 22 ATP auf dem Wege der oxidativen (chemiosmotisch gekoppelten) Phosphorylierung. Der Tricarbonsäurezyklus stellt 2 Mol ATP pro Mol Glucose durch Substratkettenphosphorylierung zur Verfügung (Gottschalk, 1985). Der größte Teil des ATP's wird auf dem oxidativen Weg bereitgestellt, so daß Substanzen, die die chemiosmotische Kopplung aufheben, die sog. Entkoppler, einen massiven Eingriff in den Energiehaushalt der Zelle ausüben.

Die Trennung der katabolischen Reaktionssequenzen von den anabolischen stellt eine grobe Vereinfachung dar, denn zahlreiche intermediäre Stoffe des Katabolismus dienen als Substrate anabolischer Reaktionssequenzen. Aus Gründen der Vereinfachung wurde aber auf eine komplexere Darstellung verzichtet.

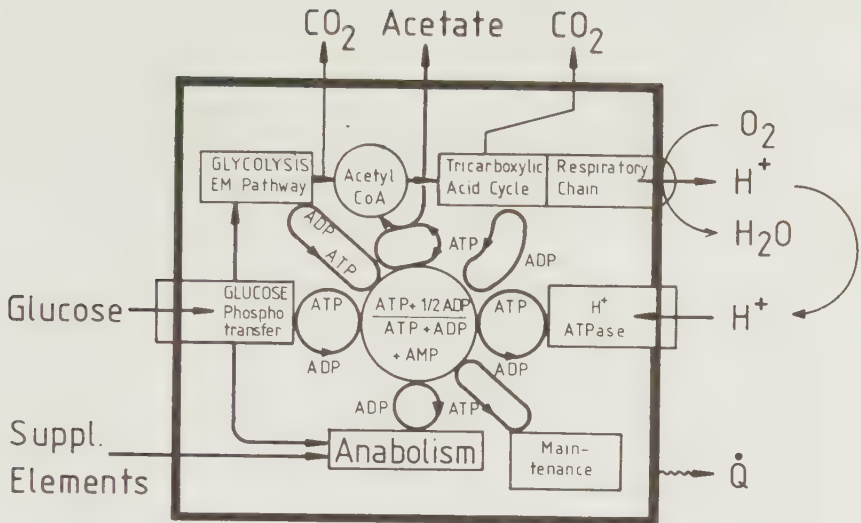


Abbildung 6.4.: Zusammenfassung einer Modellvorstellung des Stoff- und Energieflusses in der Bakterienzelle.

Der Adenylate-Energy-Charge mit dem Pool an ATP nimmt eine Mittlerrolle zwischen einzelnen biochemischen Reaktionsblöcken ein. Er wird von verschiedenen Quellen gespeist und mit verschiedenen Senken belastet. Die Gesamtheit des ATP-Umsatzes, unabhängig aus welcher Quelle oder über welche Senke, erscheint als Wärmeproduktion, wenn man die Hypothese akzeptiert, daß die anabolischen Vorgänge enthalpisch neutral verlaufen (siehe Text). Die Maintenance-Energy erscheint ebenfalls als Wärme, da sie definitionsgemäß als Energieaufwand zur Aufrechterhaltung der zellularen Integrität oder von homöostatischen Regelkreisen verstanden werden muß.

Noxen können in diesem Denkmodell an allen ATP-Fluß beeinflussenden Funktionsblöcken zu einer energetisch erfassbar Reaktion führen, während Effekte gegen anabolische Prozesse nur als Rückwirkung auf den katabolischen Stoffumsatz erfassbar werden oder indirekt durch den Verlust der Selbstreproduktion.

## 6.2. Elemente eines Modells für die Interaktion zwischen Teststoff und Mikroorganismen

Die Wechselwirkung zwischen einer Umweltchemikalie und einem Organismus ist das Resultat der Exposition (Smeets, 1978), die im aquatischen Lebensraum allgemein als Konzentration gemessen werden kann. Eine toxische Wirkung tritt nicht schlagartig ein, sondern als Folge physikalisch-chemischer und biochemischer Wechselwirkungen.

### 6.2.1. Physikalisch-chemische Wechselwirkungen

Zur Beschreibung der physikalisch-chemischen Wechselwirkung eines Stoffes mit Fischen findet sich in der Literatur das **Zwei-Kompartiment-Verteilungsmodell**, das die Aufnahme- und Abgabekinetik für eine Substanz hinlänglich beschreibt (Banerjee et al, 1984; Butte und Blum, 1984; Cairns Jr., 1980). Dieses einfache Modell, es ist nach den Angaben bei Butte und Blum in Abbildung 6.5. veranschaulicht, erfordert die Kenntnis der beiden Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  und  $k_2$ , die entweder anhand der Konzentrationsänderung des Teststoffes in der wasserigen Phase (Banerjee et al, 1984) oder anhand der zeitlichen Konzentrationsänderung im exponierten Organismus (Butte und Blum, 1984) zu ermitteln sind.

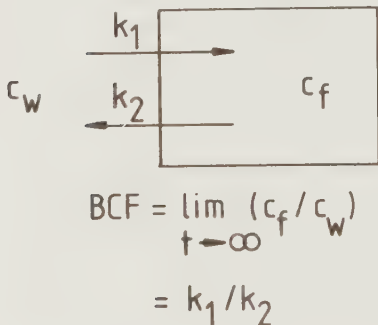


Abbildung 6.5.: Ein einfaches 2-Komponenten-Modell für die physikalisch-chemische Wechselwirkung zwischen einem organischen Teststoff und einem Traget-Organismus (nach Butte und Blum, 1984).

Einen einfachen Ansatz zur Beschreibung der zeitlichen Wechselwirkung eines toxischen Stoffes mit *Daphnia* geben Kooijman und Metz (1984) mit Gleichung 6.6., die den **LOG-LOGISTISCHEN-Typ** der Anpassung für die Konzentrationsabhängigkeit der Mortalität zugrundelegt. Eigene Daten zur Toxizitätskinetik von Quecksilber gegenüber *Escherichia coli* mit dem respirometrischen Testverfahren ließen sich mit dieser Gleichung in guter Näherung nachbilden (Weppen und Schuller, 1984b). In der Gleichung ist  $\tau$  die Zeitkonstante für die Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes der Chemikalie mit dem Organismus und  $\beta$  ist ein **Shape-Koeffizient**, der die Steigung des Anpassungsmodelles im Bereich der IC 50 Konzentration beschreibt. Die IC 50  $\infty$  ist der Schätzwert für eine mittlere effektive Konzentration, wenn ein Verteilungsgleichgewicht vorliegt. Das Modell hat im engeren Sinn nur Gültigkeit bei konstanter Exposition.

$$P = \frac{1}{(1 + (C_t / IC_{50\infty}))^{1/\beta} (1 - e^{-(t/\tau)})^{1/\beta}} \quad (Gl. 6.6.)$$

Die Übertragbarkeit dieser Modelle auf Mikroorganismen muß anhand eingehender Prüfungen beurteilt werden, die hier nicht angestellt werden können, da sich die Bestimmung zeitlicher Konzentrationsänderungen in den Organismen anhand direkter (Konzentration) oder indirekter (physiologischer Effekt) Methoden dem methodischen Instrumentarium dieser Arbeit, mit Ausnahme des Quecksilbers, entzieht, wie in Kap. 5 dargestellt wurde.

Einige zytoanatomische Besonderheiten der Bakterienzelle sind für die besondere Situation toxikologischer Untersuchungen an den verwendeten Bakterienstämmen bedeutsam, da sie in direkter Beziehung zur Wechselwirkung zwischen Teststoff und Bakterienzelle stehen.

Die typischen Gram-negativen Bakterienzellen zu denen *Escherichia coli* mit Sicherheit gehört, während *Acinetobacter calcoaceticus* Gram-variable Eigenschaften zeigt (Baumann et al, 1968), besitzen eine innere Zellmembran oder Cytoplasmamembran, die den typischen Lipid-Bilayer Aufbau aufweist und zahlreiche membrangebundene Enzymsysteme trägt. Ein periplasmatischer Raum (Stock et al, 1977), der gegen das Medium durch die äußere Zellmembran abgeschlossen ist, umschließt die Zelle. Die äußere Zellmembran ist extrem asymmetrisch aufgebaut, ihre Innenseite besteht aus Phospholipiden, während die Außenseite große Mengen Lipopolysaccharide (Lipid A) enthält, die große

hydrophile Polysaccharid-Ketten tragen. Diese äußere Zellmembran ist, im Gegensatz zur Lipid-Membran, für unpolare Stoffe nahezu impermeabel (Vaara und Nikaido, 1984). Der Transport von Substraten und Produkten findet durch kanalbildende Proteine statt. Die Porine, eine umfangreiche Klasse von Strukturproteinen, ermöglichen die Diffusion von hydrophilen Molekülen bis zum Molgewicht von etwa 600 Dalton (Nikaido und Vaara, 1985).

Der periplasmatische Raum weist gegenüber dem Außenmedium aufgrund eines Donnan-Gleichgewichtes ein negatives Potential auf, was dazu führt, daß einfach geladene anionische Komponenten im periplasmatischen Raum nur etwa ein Drittel der Außenkonzentration erreichen, während Kationen gegenüber der Umgebung angereichert werden (Stock et al, 1977). Die Situation wird noch komplexer, wenn man die verschiedenen pH-Niveaus der einzelnen Kompartimente berücksichtigen wollte, die für saure oder basische Teststoffe in jedem Kompartiment zu anderen Verhältnissen zwischen dissoziierter und undissoziierter Form führen.

Ausnahmen von diesen Eigenschaften der äußeren Zellmembranen treten auf, wenn genetische Defekte zur Bildung von Lipopolysacchariden mit stark reduzierten Polysaccharidketten führen (sog. tiefrauhe Mutanten), was sich in einer höheren Sensitivität gegenüber lipophilen Noxen auswirkt (Izaki et al, 1981). Damit dürfte die eminente Bedeutung der äußeren Zellmembran für die toxische Wirkung von Noxen gegenüber Bakterien hinreichend beleuchtet sein. Offen bleibt, ob diese Eigenschaften generell anzutreffen sind, oder ob bestimmte Bakteriengattungen völlig andere Strukturmerkmale aufweisen.

### 6.2.2. Expression toxischer Effekte

Nachdem nun ein Bild von den physikalisch-chemischen Wechselwirkungen gezeichnet wurde, das das Zustandekommen einer Dosis als Folge einer Exposition unter den besonderen Bedingungen des Testsystems *Escherichia coli* beschreibt, sollen nun einige wenige Anmerkungen zu bekannten biochemischen Wirkungen der Modellchemikalien folgen.

Quecksilber besitzt eine hohe Affinität zu Proteinen, insbesondere deren SH-Gruppen und Disulfidbrücken und kann so eine konformative Inaktivierung hervorrufen; einen umfangreichen Überblick geben Boudou et al, (1983).

Bereits seit den 50er Jahren liegen Erkenntnisse über die Wirkung von 2,4-Dinitrophenol und Pentachlorphenol als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung vor (Weinbach, 1956, 1957). Weinbach fand für PCP eine etwas stärkere Wirksamkeit als für den klassischen Entkoppler 2,4-Dinitrophenol, bezogen auf molare Konzentrationen. Im Gegensatz zu Nitrophenol führen höhere PCP-Konzentrationen zu einer Inhibierung der hydrolytischen Aktivität von ATPasen. Die glycolytische Phosphorylierung wird nach Weinbach (1956) von PCP kaum beeinflusst.

Die Interaktion entkoppelnder Phenole geht nach Weinbach und Garbus (1965) vor allem von der **anionischen Form** aus, die eine irreversible Bindungsfähigkeit an Mitochondrienproteine zeigt. Es wird angenommen, daß der Verlust der katalytischen Aktivität auf konformative Änderungen zurückzuführen ist.

Brummet und Ordal (1978) zeigen, daß PCP und analoge Entkopplersubstanzen einen inhibitorischen Einfluß auf Transportsysteme für die Aminosäuren Prolin und Glycin ausüben, der für beide Aminosäuren und die verschiedenen Entkoppler nach unterschiedlichen Inhibitormechanismen abläuft.

Bereits in der Einführung wurden von mir Hinweise auf Struktur-Toxizitäts Relationen gegeben. Betrachtet man die Gruppe der organischen Neutralstoffe, so sind die Korrelationen zwischen Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten und Toxizität recht einsichtig, umso mehr verwundert es mich, erst in sehr jungen Arbeiten Hinweise auf die erhebliche Bedeutung des pH und  $pK_s$ -Wertes saurer organischer Verbindungen, wie der Phenole, für die Toxizität der entsprechenden Komponenten zu finden. Fisher und Wadleigh (1986) zeigen an Mückenlarven (*Chironomus riparius*) drastische Unterschiede der Toxizität von PCP bei verschiedenen pH-Werten, die sich mit großen pH-Abhängigkeiten des Verteilungsgleichgewichtes zwischen wässriger Phase und Organismen erklären lassen. PCP ist bei niedrigem pH wesentlich toxischer und erreicht höhere Biokonzentrationen.

Die Arbeit von Saarikoski et al (1986) findet eine enge Beziehung zwischen der Verfügbarkeit des protonierten Phenols und der aufnahmekinetischen Konstante  $K_1$ . Die Autoren geben eine einfache Gleichung für den Flux von protonierten Phenolen an, die die Henderson-Hasselbalch-Gleichung als wichtigen Bestandteil enthält. Eine Auftragung der Gleichgewichtslage für saure organische Stoffe im Fisch *Poecilia reticulata* gegen die Differenz  $pH-pK_a$  zeigt eine starke Abnahme des Verteilungskoeffizienten mit steigendem pH.

Versuche, die Toxizitätsbefunde aus dem Respirations-Batch-Test mit dem Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten zu korrelieren, scheinen mir wenig sinnvoll, da einerseits aus der Literatur keine vollständigen Daten zu den Verteilungskoeffizienten und  $pK_s$ -Werten zu bekommen sind und andererseits derartige Korrelationen üblicherweise mit einer größeren Substanzliste angestellt werden. Die besonderen Eigenschaften der äußeren Zellmembran der Bakterien durften darüber hinaus einen wesentlichen Einfluß auf derartige korrelative Beziehungen haben, wie oben bereits diskutiert wurde.

### **6.3. Modellhypothese zur Interaktion von Noxen mit Mikroorganismen**

Inhibitorische Wechselwirkungen auf biochemischer Ebene sind zwar nicht die einzige denkbare Ursache für toxische Wirkungen (z. B. Irritationen innerhalb einer Population durch Geruchsstoffe o.ä.), spielen bei der Betrachtung von Mikroorganismen aber sicher die bedeutendste Rolle, da für mikrobielle Ein-Art-Populationen kaum typische Eigenschaften der Populations-ebene zu benennen sind, die nicht schon auf biochemischer Ebene vorhanden wären. Beispiele solcher Eigenschaften könnten

---

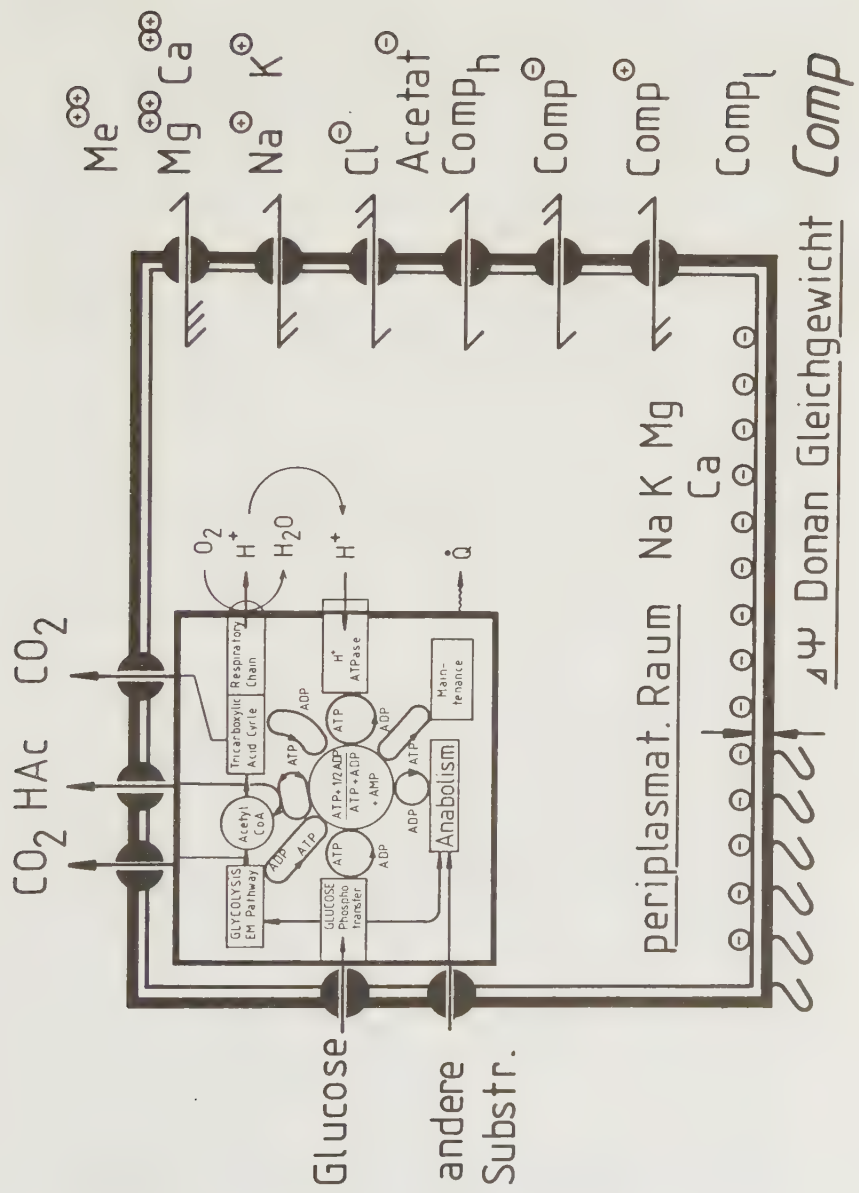
**Abbildung 6.6.: Die Gram-negative Bakterienzelle als Target eines toxikologischen Testsystems.**

Nach Literaturlage besitzt die äußere Zellmembran, die den periplasmatischen Raum gegen das Medium abgrenzt, besondere, von normalen Lipid-Membranen stark abweichende, Permeabilitätseigenschaften. Sie ist für nahezu alle Komponenten impermeabel und besitzt spezielle tunnelbildende Proteine, die Porine, die den Zutritt von hydrophilen Molekülen bis 600 Dalton ermöglichen.

Das negative Potential des periplasmatischen Raumes führt zur Beeinflussung des Verteilungsgleichgewichtes für geladene Komponenten. Die Polysaccharid-Schicht auf der Außenseite der Membran vermindert die Diffusionsgeschwindigkeit von Stoffen zur Membran-Oberfläche.

**Für Umweltchemikalien bedeutet diese Situation:**

- Kationische Komponenten werden begünstigt aufgenommen.
- Hydrophile Neutralstoffe unter 600 Dalton können frei zwischen periplasmatischem Raum und Medium ausgetauscht werden.
- Anionische Komponenten erreichen im periplasmatischen Raum eine niedrigere Konzentration, als in der Umgebung.
- Extrem lipophile Komponenten oder sehr große Moleküle werden von der Bakterienzelle nicht aufgenommen.



z.B. zelllichteabhängige sexuelle Genaustauschprozesse oder der kooperative Nutzen von Exoenzymen bei der Verwertung großmolekularer Substrate sein. Ich fand jedoch nur einen vereinzelten Hinweis auf diese Ebene der Population bei Contois (1959). Diese Situation ändert sich beim Übergang zu biozootischen Systemen oder Mikrokosmen natürlich erheblich.

Meine Arbeiten erlauben genaugenommen nur eine Abschätzung toxischer Effekte, ausgehend von einer relativ groben summarischen Erfassung der Populationsleistungen, wie Stoffwechselwärme, Substrat- und Intermediärstoffflüsse, Biomasseproduktion und daraus abgeleiteten Kriterien. Eine differenzierende interpretierende Bewertung hinsichtlich von Teilprozessen ist nur unter Zugrundelegung der oben entwickelten Modellvorstellungen möglich, die ein hochgradig vereinfachtes Abbild des **Mechanismus Bakterium** darstellen, und vom Grundgedanken her auf der Individualebene oder suborganismischen Ebene angesiedelt sind.

Die Arbeiten von Halbach et al (1983) und Kooijman und Metz (1984) belegen, daß diese reduktive Strategie sehr wirkungsvolle Beiträge zur Interpretation populationsdynamischer Effekte von Noxen liefert.

#### 6.4. Zusammenfassung

Nach den oben entwickelten Modellvorstellungen kann mithilfe der Erfassung des Summenparameters Stoffwechselenthalpie und einiger weiterer Monitoring-Parameter ein differenzierendes Bild der toxischen Wirkung von Umweltchemikalien gezeichnet werden:

- Mikrobielle Testsysteme reagieren schnell und reproduzierbar auf Teststoffe, ein Batch-Test erfordert wenige Stunden anstelle von Tagen im Vergleich zum Fisch-Test. Der Materialverbrauch ist gering und Versuchstiere werden nicht benötigt
- Der Batch-Test beschränkt den Nutzer auf einen extremen physiologischen Zustand der mikrobiellen Population, der durch maximales exponentielles Wachstum gekennzeichnet ist. Damit entgehen subtile Wirkungen einer Noxe der Beobachtung.
- Das Prinzip der Chemostatkultur in Verbindung mit dem kalorimetrischen Monitoring erlaubt die Einstellung verschiedener physiologischer Zustände der Population und ermöglicht

die Toxizitätsbewertung anhand einfach feststellbarer Wirkungen nach dem graphischen Verfahren.

- Ein Monitoring der Stoffflüsse für Substrate, Intermediärstoffe und Biomasse erlaubt den Rückschluß, daß Noxen verschiedene biochemische Leistungen der Bakterienkultur unterschiedlich starkt angreifen. Zum Beispiel weist die Ausschüttung von Acetat schon bei niedrigen Konzentrationen der Teststoffe auf ein Ungleichgewicht zwischen Glycolyse und Tricarbonsäurezyklus hin. Der Zusammenbruch des energetischen Yields deutet darauf hin, daß entweder die Maintenance-Energy stark ansteigt oder aber, und das erscheint mir auf der Grundlage der referierten Wirkmechanismen einsichtiger, die Effizienz der chemiosmotischen Kopplung der oxidativen Phosphorylierung stark abnimmt (sog. Entkopplung).
- Der Energy-Yield bietet eine vereinheitlichende Beschreibung der Befunde mit gehemmter oder stimulierter Wärmeproduktion (Beispiel Phenol).
- Ein analytischer Hinweis auf die Lücke in der enthalpischen Bilanzierung konnte nicht erbracht werden. Es bleibt die Frage offen, ob die Vergrößerung dieser Lücke nach Zugabe von Phenol und 2-Nitrophenol einer Ausschüttung weiterer Intermediärstoffe oder einem systematischen analytischen Fehler (bes. der Glucose-Analytik) zuzuschreiben ist.
- Unterschiedliche Wirkeffekte einer Noxe bei verschiedenen Wachstumsraten der Chemostatkultur lassen sich mit der Wachstumsdynamik in Beziehung setzen. Bei niedriger D-Rate ist die Exposition gegenüber hohen Teststoffkonzentrationen recht langfristig, während sie bei hohen D-Raten schnell abnimmt. Im Gegensatz hierzu verfügt die Kultur bei niedriger D-Rate über ein großes verfügbares Reaktionspotential (Daigger und Grady, 1982), das eine schnelle Wiederherstellung des ursprünglichen Steady state ermöglicht, während eine Population nahe an der maximalen Wachstumsrate nur sehr geringe zusätzliche Zuwachsraten aufbringen kann. Die Wiederherholung der Chemostat-Kultur wird damit eher zu einem Problem ihrer eigenen Life-History und der aktuellen D-Rate, als zu einem Resultat der anwesenden Teststoffkonzentration, während die Reaktion im Moment der Teststoffgabe direkt den toxischen Wirkungen und dem herrschenden physiologischen Zustand zugeordnet werden kann.
- Versuche mit Langzeitexpositionen gegenüber dem Teststoff PCP weisen auf die Fähigkeit der bakteriellen Population zur Anpassung hin, da die beobachtbaren Effekte gegenüber der

Wärmeproduktion, dem Energy-Yield oder den Stoffumsätzen erheblich unter den Wirkungen von Batch-Dosierungen gleicher Konzentration zurückbleiben.

Die große Menge an Belegmaterial legt folgende Hypothesen zu einem differenzierenden Bild toxischer Effekte gegenüber dem Stoff- und Energiefluß von mikrobiellen Populationen nahe:

- Toxizität äußert sich am intakten Organismus als Resultat des Zusammenwirkens von Einzeleffekten.
- Ein deskriptives Modell kann aus der Kombination von biochemischen Funktionseinheiten bestehen, für die jeweils ein mathematischer Ansatz über die Dosis-Wirkungsbeziehungen und die Reaktionsgeschwindigkeiten aufgestellt werden muß. Nach den vorliegenden Untersuchungen ist die oxidative Verwertung der Substrate in Übereinstimmung mit der Literatur sensiti-ver gegen phenolische Schadstoffe als die glycolytische.
- Die gram-negative Bakterienzelle, als deren Typvertreter *Escherichia coli* angesehen werden kann, stellt aufgrund ihrer zellulären Architektur einen selbständigen Modellfall eines biologischen Targets für Umweltchemikalien dar, der nicht geeignet ist, andere Modelle, wie den Fischtest, zu ersetzen, sondern eigene Qualitäten in ein Testsystem ein-bringt, die nicht durch andere Testspezies ersetzt werden können.

#### 6.1. Die innovativen Anteile dieser Arbeit

Kalorimetrie an Mikroorganismen ist kein neues Arbeitsfeld der Kalorimetrie. Erste Untersuchungen an aeroben Kulturen von *Escherichia coli* beschreiben Rothbaum und Stone (1961), die die aeroben Bedingungen durch Auftragung der Bakteriensuspension auf Asbestfasern sicherstellen. Die Nutzung des Calvet-Kalorimeters bringt erhebliche Gewinne an Empfindlichkeit und wird zur Analyse Kinetischer Parameter des Wachstums von *Escherichia coli* in anaerober (Belaich und Belaich, 1976) und aerober Batch-Kultur herangezogen (Dermoun und Belaich, 1979). Einen Entwicklungssprung bringt die Nutzung von Flow-Kalorimetern in Verbindung mit Fermentern (Cardoso-Duarte et al, 1976; Brettel et al, 1980), die eine systematische Untersuchung der Batch- und Chemostat-Kultur ermöglicht.

Ishikawa und Shoda (1983) berichten über Kalorimetrische Analysen an Chemostat-Kulturen, zu denen eine Kalorimeterkonstruktion verwendet wird, die der hier benutzten ähnelt. Wie

in dieser Arbeit und unseren Veröffentlichungen (Kahle et al, 1981; Schuller und Weppen, 1983; Weppen 1983) wird die Kalorimetermeßzelle einer Zwillingsanordnung als Meß- und Fermenterraum zugleich genutzt.

Von Seiten der Kalorimetrischen Technik liegt somit zwar keine grundsätzliche Innovation vor, die zeitgleiche Entwicklung eines Kalorimetersystems unter dem gleichen Konzeptionellen Grundgedanken, sowie grundsätzlich vergleichbare Ergebnisse an der Chemostatkultur im steady-state bei den Autoren Ishikawa und Shoda (1981, 1983) stützen aber die Validität des Konzeptes.

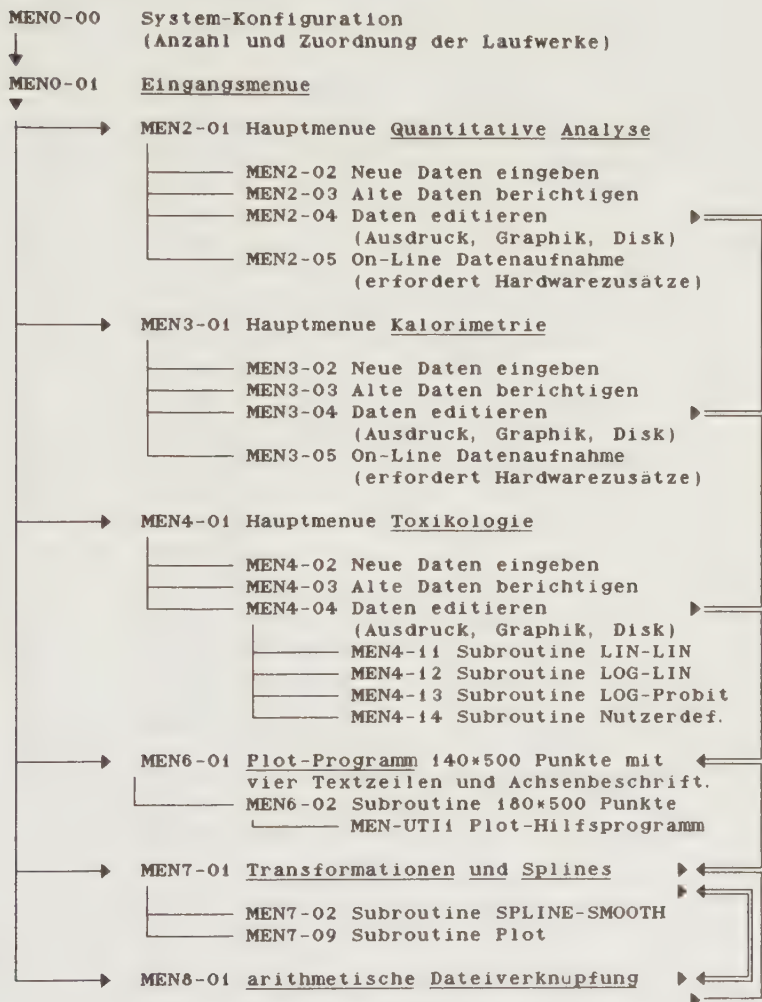
Mikrobielle Systeme als Toxizitätstestsysteme finden vielfache Anwendung, kalorimetrische Methoden zur Erfassung des toxischen Effektes hingegen werden nur vereinzelt genutzt. Beispiele finden sich bei Marti et al (1979), Redl und Tiefenbrunner (1981) oder Hartung (1985), der eine systematische Anwendung beschreibt. Etwas breitere Anwendung findet die kalorimetrische Detektion biologischer Wirkungen im pharmakologischen Sektor (Chowdhry et al, 1983).

Kalorimetrisch-toxikologische Untersuchungen an Chemostaten haben, soweit die recherchierte Literatur zeigt, bisher nicht stattgefunden, so daß das Konzept des energieflußorientierten Monitorings an der Chemostatkultur als Minimalmodell der aquatischen mikrobiellen Biozönose als Innovation angesehen werden kann. Zwar liegen Arbeiten vor, in denen Chemostaten als Target dienen (Mayfield et al, 1980; Dean et al, 1976), in diesen Arbeiten werden aber völlig abweichende Monitoring-Methoden, wie die Keimzahlbestimmung, eingesetzt.

Es muß zukünftigen Arbeiten vorbehalten bleiben, die entwickelten Konzepte in ein mathematisches Modell umzusetzen, oder stoff- und energieflußorientierte Analysen zur Toxizität von Umweltchemikalien an mikrobiellen Biozönosen zu erarbeiten. Erste eigene Arbeiten an einem biologischen Rasen mit einer differenzierten Aufwuchsmikroflora wurden während der letzten Monate ausgeführt, aus Gründen der Übersichtlichkeit hier jedoch nicht berücksichtigt.

Die Erarbeitung eines mathematischen Modelles ist eine anspruchsvolle Aufgabe, die im Rahmen dieser Arbeit und ohne die Mitarbeit eines versierten Systemanalytikers nicht zu leisten war und deshalb einer selbständigen zukünftigen wissenschaftlichen Arbeit überlassen werden muß.





— Verknettung der Programmteile

== Datentransfer zwischen Hauptprogrammen über die Diskette: ▶◀ Bidirektional; ▶= nur Schreiben; ◀= nur lesen

Zum Betrieb des Softwarepaketes ist ein IBM-PC oder kompatibler Rechner mit mindestens einem Disk-Laufwerk und 64 kByte Speicherplatz sowie Farb-Graphik Erweiterung erforderlich. Zur Ausgabe von Daten und Graphik ist ein Matrix-Drucker Sakata SP-1200Plus (Schönschrift-Dokumentation) oder vergleichbar erforderlich.

Die On-Line Datenaufnahme erfordert Hardwareergänzungen und Software-Erweiterungen.

Die Software arbeitet im IBM-Basica Vers. 2.0, unter dem Betriebssystem PC-DOS-Vers. 2.10.

## Anhang II: Glossar

|            |                                                                                      |         |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| ADH        | Alkohol-Dehydrogenase                                                                |         |
| Acetyl-CoA | Acetyl-Coenzym-A                                                                     |         |
| AMP        | Adenosinmonophosphat                                                                 |         |
| ADP        | Adenosindiphosphat                                                                   |         |
| ATP        | Adosintriposphat                                                                     |         |
| BCF        | Biokonzentrationsfaktor ( $C_f/C_w$ )                                                |         |
| BTM        | Biotrockenmasse                                                                      |         |
| CVAAS      | Cold-Vapor-Atomic-Absorption-Spectrophotometry                                       |         |
| D          | Dilution-Rate $\equiv$ Medium-Flow/Reaktorvolumen                                    | [1/h]   |
| FID        | Flammen-Ionisations-Detektor                                                         |         |
| $\Delta H$ | Reaktionsenthalpie                                                                   | [J/Mol] |
| IC-50      | Teststoffkonzentration, die eine 50%ige Hemmung einer biologischen Aktivität ausübt. |         |
| $K_{ow}$   | Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient                                                |         |
| $K_s$      | Affinitätskonstante der Michaelis-Menten-Gleichung                                   | [Mol/l] |
| MEC        | Minimale Effektive Konzentration                                                     |         |
| MIC        | Minimale Inhibitorische Konzentration                                                |         |
| $NAD^+$    | Nicotinamadenindinucleotid (oxidiert)                                                |         |
| $NADH+H^+$ | Nicotinamadenindinucleotid (reduziert)                                               |         |
| PCP        | Pentachlorphenol                                                                     |         |
| P&G-Medium | Synthetisches Kulturmedium (siehe Seite 28)                                          |         |
| Q          | Wärmemenge                                                                           | [ J ]   |
| Q          | Wärmestrom                                                                           | [J/s]   |
| $S_r$      | Substratkonzentration im Vorrat                                                      | [Mol/l] |
| S          | Substratkonzentration im Reaktor                                                     | [Mol/l] |
| $S_l$      | limitierende Substratkonzentration                                                   | [Mol/l] |
| $\Delta T$ | Differenztemperatur                                                                  | [ K ]   |
| X          | Biomassekonzentration                                                                | [g/l]   |
| Y          | Yield-Koeffizient                                                                    |         |
| $Y_{tr}$   | Wahrer Yield-Koeffizient (Pirt, 1966)                                                |         |
| VFA        | Volatile-Fatty-Acid (C1- bis C6-Carbonsäuren)                                        |         |
| $\mu$      | spezifische Wachstumsrate                                                            | [1/h]   |
| $\tau$     | Zeitkonstanten                                                                       | [ s ]   |



# Literaturverzeichnis

**Adema Jr., D.M.M. & G.J. Vink (1981):** A comparative study of the toxicity of 1,1,2-Trichlorethane, Dieldrin, Pentachlorophenol and 3,4-Dichloroaniline for marine and freshwater organisms. *Chemosphere*, Vol. 10: pp. 533-554

**Amin, G., E. van den Eynde & H. Verachtert (1983):** Determination of by-products formed during the ethanolic fermentation using batch and immobilized cell systems of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces bayanus*. *European Journal of applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 18: pp. 1-5

**Ansbaek, J. & T.H. Blackburn (1980):** A Method for the analysis of acetate turnover in a coastal marine sediment. *Microbial Ecology*, Vol. 5: pp. 253-264

**Aoki, K., K. Ohtsuka, R. Shinke & M. Nishira (1984):** Rapid biodegradation of aniline by *Frateriella* species ANA-18 and its Aniline metabolism. *Agric. Biol. Chem.*, Vol 48: pp. 865-872

**Babich, H. & G. Stotzky (1983):** Influence of chemical speciation on the toxicity of heavy metals to the microbiota. In: J.O. Nriagu (Ed.): *Aquatic Toxicology*; John Wiley & Sons, New York: pp. 1-45

**Banerjee, S., R.H. Sugatt & D.P. O'Grady (1984):** A simple method for determining bioconcentration parameters of hydrophobic compounds. *Environmental Science and Technology*, Vol. 18: pp. 79-81

**Barcelona, M.J., H.M. Liljestrand & J.J. Morgan (1980):** Determination of low molecular weight volatile fatty acids in aqueous samples. *Analytical Chemistry*, Vol. 52: pp. 321-325

**Battley, E.H. (1960):** A theoretical approach to the study of the thermodynamics of growth of *Saccharomyces cerevisiae* (Hansen). *Physiologia Plantarum*, Vol. 13: pp. 647-685

**Battley, E.H. (1960a):** Growth reaction equations for *Saccharomyces cerevisiae*. *Physiologia Plantarum*, Vol. 13: pp. 192-203

**Battley, E.H. (1960b):** Enthalpy changes accompanying the growth of *Saccharomyces cerevisiae* (Hansen). *Physiologia Plantarum*, Vol. 13: pp. 628-640

**Baumann, P., M. Doudoroff & R.Y. Stanier (1968):** A study of the moraxella group. II. Oxidative-negative Species (genus *Acinetobacter*). *Journal of Bacteriology*, Vol. 95(5): pp. 1520-1541

**Belaich, A. & J.P. Belaich (1976):** Microcalorimetric studies of the anaerobic growth of *Escherichia coli*: Growth thermograms in a synthetic medium. *Journal of Bacteriology*, Vol. 125(1): pp. 14-18

**Belaich, J.P. (1980):** Growth and metabolism in bacteria. In: A.E. Beezer (Ed.): *Biological Microcalorimetry*. Academic Press, London: pp. 1-42

**Beltrame, P., P.L. Beltrame, P. Carniti & D. Pitea (1979):** Kinetics of Phenol degradation by activated sludge. Value of measurements in a batch reactor. *Water Res. Pol.*, Vol. 13: pp. 1305-1309

**Bergmeyer, H.U. (1977):** Bestimmung der Substanz-Konzentration von Metaboliten (Endwert Methoden). In: H.U. Bergmeyer und H. Gawehn (Ed.): *Grundlagen der enzymatischen Analyse*. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 41-57

**Booth, I.R. (1985):** Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological Reviews*, Vol. 49(1985): pp. 359-378

**Boudou, A., D. Georgescauld & J.P. Desmazes (1983):** Ecotoxicological role of the membrane barriers in transport and bioaccumulation of mercury compounds. In: J. O. Nriagu (Ed.): *Aquatic Toxicology*. Verlag John Wiley & Sons, New York: pp. 117-132

**Bowman, B.T. & W.W. Sans (1983):** Determination of octanol-water partitioning coefficients ( $K_{ow}$ ) of 61 organophosphorous and carbamate insecticides and their relationship to respective water solubility ( $S$ ) values. *Journal of Environmental Science and Health*, Vol. B18(6): pp. 667-683

**Brettel, R., I. Lamprecht & B. Schaarschmidt (1980):** Microcalorimetric investigations of the metabolism of yeasts. VII. Flow-calorimetry of aerobic batch-culture. *Radiation and Environmental Biophysics*, Vol. 18: pp. 301-309

**Brettel, R., I. Lamprecht & B. Schaarschmidt (1981):** Microcalorimetric investigations of the metabolism of yeasts. Growth in chemostat cultures on glucose. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 11: pp. 205-211

**Bringmann, G. (1978):** Bestimmung der biologischen Schädigung wassergefährdender Stoffe gegen Protozoen. Teil I. *Z. Wasser-Abwasser-Forsch.*, Vol. 11: pp. 210-215

**Bringmann, G. & R. Kühn (1977):** Grenzwerte der Schadwirkung wassergefährdender Stoffe gegen Bakterien (*Pseudomonas putida*) und Grünalgen (*Scenedesmus quadricauda*) im Zellvermehrungshemmtest. Z. Wasser- Abwasser-Forsch., Vol. 10: pp. 87-98

**Bringmann, G. & R. Kühn (1980):** Bestimmung der biologischen Schadwirkung wassergefährdender Stoffe gegen Protozoen. II. Bakterienfressende Ciliaten. Z. Wasser- Abwasser-Forsch., Vol. 13: pp. 26-31

**Bringmann, G. & R. Kühn (1982):** Ergebnisse der Schadwirkung wassergefährdender Stoffe gegen *Daphnia magna* in einem weiterentwickelten standardisierten Testverfahren. Zeitschrift für Wasser- und Abwasser-Forschung, Vol. 15: pp. 1-6

**Bringmann, G., R. Kühn & A. Winter (1980):** Bestimmung der biologischen Schadwirkung wassergefährdender Stoffe gegen Protozoen III. Saprozoische Flagellaten. Zeitschrift für Wasser- und Abwasser-Forschung, Vol. 13: pp. 170-173

**Brown, H.D. (1969):** Biochemical Microcalorimetry. Academic Press, New York: pp. 306-317

**Brummett, T.B. & G.W. Ordal (1977):** Inhibition of amino-acid transport in *Bacillus subtilis* by uncouplers of oxidative phosphorylation. Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 178: pp. 368-372

**Brunnert, H. & F. Zadrazil (1983):** The translocation of mercury and cadmium into the fruiting bodies of six higher fungi: A comparative study on species specificity in five Lignocellulolytic fungi and the cultivated mushroom *Agaricus*. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 17: pp. 358-364

**Buckman, N.G., J.O. Hill, R.J. Magee & M.J. McCormick (1984):** Separation of substituted phenols, including eleven priority pollutants using High-Performance-Liquid-Chromatography. Journal of Chromatography, Vol. 284: pp. 441-446

**Buikema Jr., A.L., B.R. Niederlehner & J. Cairns Jr. (1982):** Biological monitoring Part IV - Toxicity testing. Water Research, Vol. 16: pp. 239-262

**Butte, W. & J.K. Blum (1984):** Calculation of bioconcentration factors from kinetic data by non linear iterative least squares regression analysis using a programmable mini-calculator. Chemosphere, Vol. 13: pp. 151-160

**Butte, W., J. Denker, M. Kirsch & Th. Hopner (1985):** Penta-chlorophenol and tetrachlorophenols in wadden sediments and Clams *Mya arenaria* of the Jadebusen after a 14-year period of waste-water discharge containing Pentachlorophenol. Environmental Pollution (Series B), Vol. 9: pp. 29-39

**Butte, W., C. Fooker, R. Klussmann & D. Schuller (1982):** Die Messung der Lipophilität mit Hilfe der reversed phase HPLC und HPTLC. Kontakte (Merck), 1982(3): pp. 25-31

**Butte, W., J. Eilers & M. Kirsch (1982):** Trialkylsulfonium- and Trialkylseleniumhydroxides for the pyrolytic alkylation of acidic compounds. Analytical Letters, Vol. 15(A10): pp. 841-850

**Button, D.K. (1985):** Kinetics of nutrient-limited transport and microbial growth. Microbiological Reviews, Vol. 49(3): pp. 270-297

**Cairns Jr., J. (1980):** Estimating Hazard. BioScience, Vol. 30(2): pp. 101-107

**Cairns Jr., J. (1981):** Review paper: Biological monitoring part IV - future needs. Water Research, Vol. 15: pp. 941-952

**Cairns Jr., J. (1983):** Are single species toxicity tests alone adequate for estimating environmental hazard? Hydrobiologia, Vol. 100: pp. 47-57

**Cairns Jr., J., K.W. Thompson, J.D. Landers Jr., M.J. McKee & A.C. Hendricks (1980):** Suitability of some fresh water and marine fishes for use with a microcomputer interfaced biological monitoring system. Water Resources Bulletin (The American water resources association), Vol. 16: pp. 421-427

**Cardoso-Duarte, J.M., M.J. Marinho & N. van Uden (1976):** Flow microcalorimetry of the chemostat. In: A.C.R. Dean, D.C. Ellwood, C.G.T. Evans & J. Melling (Eds.): Continuous culture Vol. 6B; Applications and new fields. Ellis Horwood, LTD., Pubs. Chichester: pp. 40-48

**Carr, R.S., P. Thomas & J.M. Neff (1982):** A simple spectrophotometric technique for the determination of Pentachlorophenol in water. Bull. Environm. Contam. Toxicol., Vol. 28: pp. 477-479

**Caspers, N. & B. Hamburger (1983):** Aquatische Modellökosysteme als Indikatoren für Schadstoffbelastungen. Z. Wasser- Abwasser-Forsch., Vol. 16: pp. 205-210

**Chan, P.K., G.P. O'Hara & A.W. Hayes (1984):** Principles and methods for acute and subchronic toxicity. In: A.W. Hayes (Ed.): Principles and Methods of Toxicology. Student Edition, Raven Press, New York (1984): pp. 1-51

**Chase, L.M. (1977):** A dynamic kinetic model of the activated sludge process. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 19: pp. 1431-1447

**Cheng, K.L. & B.L. Goydich (1966):** 4,4-Bis(Dimethylamino)Thio-benzophenone as a sensitive reagent for Mercury and Palladium. Microchemical Journal, Vol. 10: pp. 158-170

**Chistyakova, T.A., I.G. Minkevich & V.K. Eroshin (1983):** Growth of the thermotolerant yeast, *Candida valida*, on ethanol: Dependence of maximum growth rate and cell biomass yield on temperature. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 18: pp. 225-228

**Chohji, Tetsuji & T. Sawada (1983):** Effects of temperature shift on growth rate of *Escherichia coli* at lower glucose concentrations. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 25(1983): pp. 2991-3003

**Chowdhry, B.Z., A.E. Beezer & E.J. Greenhow (1983):** Analysis of drugs by microcalorimetry, isothermal power-conduction calorimetry and thermometric titrimetry. Talanta, Vol. 30: pp. 209-243

**Christen, H.R. (1973):** Grundlagen der allgemeinen und anorganischen Chemie. Verlag Sauerländer, Aarau; Diesterweg-Salle, Frankfurt

**Chu, J.P. & E.J. Kirsch (1972):** Metabolism of pentachlorophenol by an axenic bacterial culture. Appl. Microbiol., Vol. 23: pp. 1033-1035

**Colenut, B.A. (1979):** The sampling and gaschromatographic analysis of fatty acids from landfill sites. Intern. J. Environmental Anal. Chem., Vol. 7: pp. 71-77

**Contois, D.E. (1959):** Kinetics of bacterial growth: relationship between population density and specific growth rate of continuous culture. Journal of General Microbiology, Vol. 21: pp. 40-50

**Daigger, G.T. & C.P.L. Grady Jr. (1982):** Review paper: The dynamics of microbial growth on soluble substrates. Water Research, Vol. 16: pp. 365-382

**Davies, R.G. (1971):** Computer programming in quantitative biology. Academic Press, London, 492 pp.

**Dean, A.C.R., D.C. Ellwood, J. Melling & A. Robinson (1976):** The action of antibacterial agents on bacteria grown in continuous culture. In: A.C.R. Dean, D.C. Ellwood, C.G.T. Evans & J. Melling (Eds.): Continuous culture 6: Applications and new fields. Ellis Horwood LTD., Publisher, Chichester, pp. 251-261

**Dermoun, Z. & J.P. Belaich (1979):** Microcalorimetric study of *Escherichia coli* aerobic growth: Kinetic and experimental enthalpy associated with growth on succinic acid. *Journal of Bacteriology*, Vol. 140: pp. 377-380

**Drews, G. (1976):** Mikrobiologisches Praktikum. Dritte neubearbeitete Auflage. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

**Dutka, B.J. & K.K. Kwan (1981):** Comparison of three microbial toxicity screening tests with the microtox test. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, Vol. 27: pp. 753-757

**Edgehill, R.U. & R.K. Finn (1983):** Activated sludge treatment of synthetic wastewater containing pentachlorophenol. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 25(1983): pp. 2165-2176

**Esener, A.A., J.A. Roels, N.W.F. Kossen & J.W.H. Roozenburg (1981):** Description of microbial growth behaviour during the wash-out phase; determination of the maximum specific growth rate. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 13: pp. 141-144

**Fenchel, T. & B.J. Finlay (1983):** Respiration rates in heterotrophica, free living protozoa. *Microb. Ecol.*, Vol. 9: pp. 99-122

**Fieschko, J. & A.E. Humphrey (1984):** Statistical analysis in the estimation of maintenance and true growth yield coefficients. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 26: pp. 394-396

**Fisher, S.W. & R.W. Wadleigh (1986):** Effects of pH on the acute toxicity and uptake of  $^{14}\text{C}$  Pentachlorophenol in the midge, *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology and Environmental Chemistry*, Vol. 11(1986): pp. 1-8

**Fortier, J.L., B. Reboul, P. Philip, M.-A. Simard, P. Picker & C. Jolicoeur (1980):** Calorimetric studies of biodegradation processes in biological wastewater treatment. *Journal Water Pollution Control Federation (WPCF)*, Vol. 52: pp. 89-97

**Fowler, S.W., J. La Rosa & W.C. Renfro (1975):** Effect of different radiotracer labeling techniques on radionuclide excretion from marine organisms. *Marine Biology*, Vol. 30: pp. 297-304

**Galassi, S. and M. Vighi (1981):** Testing toxicity of volatile substances with algae. *Chemosphere*, Vol. 10: pp. 1123-1126

**Gerhart, D. Z., S.M. Anderson & J. Richter (1977):** Toxicity bioassay with periphyton communities: Design of experimental streams. *Water Research*, Vol. 11: pp. 567-570

**Gnaiger, E. (1979):** Direct calorimetry in ecological energetics. Long term monitoring of aquatic animals. In: E. Marti, H.R. Oswald, H.G. Wiedemann (Eds.): *Angewandte chemische Thermodynamik und Thermoanalytik; Vorträge des Rappersweiler TA-Symposiums*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 155-165

**Goel, S.C. & N.B. Pamment (1984):** Direct injection technique for gas chromatographic determination of ethanol and other volatiles in concentrated cell suspensions. *Biotechnology Letters*, Vol. 6: pp. 177-182

**Golimowski, J. & I. Gustavsson (1983):** Determination of mercury in freeze-dried muscle samples of Pike, Cod and Perch using an ASV technique. *The Science of the Total Environment*, Vol. 31: pp. 89-98

**Gottschalk, Gerhard (1985):** Bacterial metabolism. Second Edition. Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo; 359 pp.

**Gustafsson, K. & L. Gustafsson (1983):** Heat changes, respiratory activities, ATP-pools and metabolic potentialities in natural sediment samples treated with a quarternary amine. *OIKOS*, Vol. 41(1983): pp. 64-72

**Haas, H.F. & V. Krivan (1984):** Open wet ashing of some types of biological materials for the determination of mercury and other toxic elements. *Talanta*, Vol. 31(4): pp. 307-309

**Halbach, U. (Nachfolger: M. Siebert) (1984):** Populationsdynamik von Rotatorien als Indikator für sublethale Schadstoffwirkungen. In: B. Scheele, F. Führ und F. Stüttgen (Eds.): *Methoden zur ökotoxikologischen Bewertung von Chemikalien*. Bd.5: *Aquatiscche Systeme Teil II*. Projektberichte Jül-Spez-276; ISSN 0343-7639: pp.206-229

**Halbach, U., M. Siebert, C. Wissel, K. Beuter & M. Delion (1981):** Population dynamics of rotifers as bioassay tool for toxic effects of organic pollutants. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* Vol. 21: pp. 1141-1146

**Halbach, U., M. Siebert, W. Westermayer & C. Wissel (1983):** Population ecology of rotifers as a bioassay tool for ecotoxicological tests in aquatic environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 7: pp. 484-513

**Hall, L.H. & L.B. Kier (1984):** Molecular connectivity of phenols and their toxicity to fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, Vol. 32: pp. 354-362

**Haltrich, W.G. (1981):** Testing of chemical substances for environmental effects - an important task for the chemical industry. *Toxicological and Environmental Chemistry*, Vol. 3: pp. 201-213

**Hapke, H.J. (1981):** Possibilities and limitations of ecotoxicological testing of chemicals. *Toxicological and Environmental Chemistry*, Vol. 3: pp. 227-237

**Hart, K. & J. Cairns Jr. (1984):** The maintenance of structural integrity in freshwater protozoan communities under stress. *Hydrobiologia*, Vol. 108: pp.171-180

**Hartung, J. (1985):** On the use of flow microcalorimetry in estimating the biological effect of adverse substances on *E. coli*. IV. An investigation on 5 test substances. *Thermochimica Acta*, Vol. 94: pp. 179-186

**Hemminger, W. & G. Hohne (1979):** Grundlagen der Kalorimetrie. Verlag Chemie, Weinheim 1979

**Hensel, J. & G. Straube (1983):** Physiologie des Phenolabbaus bei *Rhodococcus spec.* Pl. Teil 1: Beziehungen zwischen Wachstum und Phenolabbau. *Acta hydrochim., et hydrobiol.*, Vol. 11: pp. 637-645

**Herbert, D. (1976):** Stoichiometric aspects of microbial growth. In: A.C.R. Dean, D.C. Ellwood, C.T.G. Evans & J. Melling (Eds.): Continuous culture 6: Applications and New Fields. Ellis Horwood LTD., Publisher, Chichester, pp. 1-30

**Herbert, D., R. Elsworth & R.C. Telling (1956):** The continuous culture of bacteria; a theoretical and experimental study. *Journal of General Microbiology*, Vol. 14(8): pp. 601-622

**Hickman, G.T. & J.T. Novak (1984):** Acclimation of activated sludge to pentachlorophenol. *Journal Water Pollution Control Federation (WPCF)*, Vol. 56(4): pp. 364-369

**Ho, M.K. & G.A. Regnitz (1985):** Potentiometric system for selective formate measurement and improvement of response characteristics by permeation of cells., *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 27(1985): pp. 1634-1639

**Höpner, Th. & J. Knappe (1974):** Formate. Determination with formate dehydrogenase. In: H.U. Bergmeyer (Ed.): *Methods of enzymatic analysis*, Vol.3; Academic Press, Inc., New York, pp. 1551-1554

**Holcombe, G.W., G.L. Phipps & J.T. Flandt (1983):** Toxicity of selected priority pollutants to various aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 7: pp. 400-409

**Honig, R.A., M.J. McGinnis, A.L. Buikema, Jr. & J. Cairns, Jr. (1980):** Toxicity tests of aquatic pollutants using *Chilomonas paramecium* Ehrenberg (Flagellata) populations. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, Vol. 25: pp. 169-175

**Ishikawa, Y. & M. Shoda (1981):** Design and performance of a new microcalorimetric system for aerobic cultivation of microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 23(1981): pp. 2629-2640

**Ishikawa, Y. & M. Shoda (1983):** Calorimetric analysis of *Escherichia coli* in continuous culture, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 25(1983): pp. 1817-1827

**Ishikawa, Y., Y. Nonoyama & M. Shoda (1981):** Microcalorimetric studies of aerobic growth of *Escherichia coli* in batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 23(1981): pp. 2825-2836

**Itano, Kazuomi, S. Kawai, N. Miyazaki, R. Tatsukawa & T. Fujiyama (1984):** Mercury and selenium levels in striped dolphins caught off the pacific coast of japan. *Agric. Biol. Chem.*, Vol. 48(5): pp. 1109-1116

**Itoh, Shigekazu & K. Takahashi (1984):** Calorimetric studies of microbial growth: Kinetic analysis of growth thermograms observed from bakery yeast at various temperatures. *Agric. Biol. Chem.*, Vol. 48(2): pp. 271-275

**Izaki, K., M. Takahashi, Y. Sato, Y. Sasagawa, K. Sato & C. Furusaka (1981):** Some properties of pentachlorophenol-resistant gram-negative bacteria, *Agric. Biol. Chem.*, Vol. 45: pp. 765-767

**Jacob, P. & S. Jancar (1985):** Basic Interpolationen - Approximationen - Splines - FFT: H. Kohler (Ed.): *Vieweg Programmothek 4*: Verlag Friedr. Vieweg und Sohn, Braunschweig/Wiesbaden

**Janssen, E.** (1982): Bestimmung von Quecksilber in Futtermitteln nach Druckaufschluss. Landwirtschaftliche Forschung, Vol. 35(1982): pp. 280-284

**Jonas, R.B., C.C. Gilmour, D.L. Stoner, M.M. Weir & J.H. Tuttle** (1984): Comparison of methods to measure acute metal and organo-metal toxicity to natural aquatic microbial communities. Appl. Environm. Microbiol., Vol. 47: pp. 1005-1011

**Juhnke, I. & D. Ludemann** (1978): Ergebnisse der Untersuchung von 200 chemischen Verbindungen auf akute Fischtoxizität mit dem Gold-orfentest. Zeitschrift für Wasser- und Abwasser-Forschung, Vol. 11: pp. 161-164

**Kacac, Bohumil & Z. J. Vejdelek** (1983): Handbuch der photometrischen Analyse organischer Verbindungen; 2. Ergänzungsband. Verlag Chemie, Weinheim: pp. 46-47

**Kahle, J., H.H. Riemann, P. Weppen, D. Schuller & I. Wolke** (1981): La technique de calorimetrie en culture continue microbienne. Communication presentee aux Journees de Calorimetrie et d'Analyse Thermique, Universite de Nancy I; 14-15 Mai 1981.

**Kaufmann, R. & E. Gnaiger** (1981): Optimization of calorimetric systems: Continuous control of the baseline stability by monitoring thermostat temperature. Thermochimica Acta, Vol. 49: pp. 63-74

**Kenaga, E. E.** (1978): Test organisms and methods useful for early assessment of acute toxicity of chemicals. Environ. Sci. Technol., Vol. 12: pp. 1322-1329

**Kirsch, E. J. & Etzel, J. E.** (1973): Microbial decomposition of Pentachlorophenol. Journal Water Pollution Control Federation (WPCF), Vol. 45: pp. 359-364

**Knackmuss, H. J.** (1983): ,In: K. Dohmen (Ed.): Biotechnologie. J.B. Metzlersche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart: pp. 158-170

**Kooijman, S. A. L. M.** (1981): Parametric analyses of mortality rates in Bioassays. Water Research, Vol. 15: pp. 107-119

**Kooijman, S. A. L. M. & J. A. J. Metz** (1984): On the dynamics of chemically stressed populations: the deduction of population consequences from effects on individuals. Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 8: pp. 254-274

**Kuiper, J. & A.O. Hanstveit (1984a):** Fate and effects of 3,4-Dichloroaniline (DCA) in marine plankton communities in experimental enclosures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 8: pp. 34-54

**Kuiper, J. & A.O. Hanstveit (1984b):** Fate and effects of 4-Chlorophenol and 2,4-Dichlorophenol in marine plankton communities in experimental enclosures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 8: pp. 15-33

**Kunkel, E. (1972):** Beitrag zur Spurenanalyse von Quecksilber durch Wickbold-Verbrennung und flammenlose Atomabsorption. *Z. Anal. Chem.*, Vol. 258: pp. 337-341

**Kwasniewska, K. & Kaiser, K.E. (1983):** Toxicities of selected phenols to fermentative and oxidative yeasts. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* Vol. 31: pp. 188-194

**LaCroix, S.J. & V.J. Cabelli (1982):** Membrane filter method for enumeration of *Acinetobacter calcoaceticus* from environmental waters. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 43: pp. 90-96

**Lamprecht, I.H.D. & F.-R. Matuschka (1985):** Microcalorimetric investigations of the energy metabolism of some reptiles. *Thermo-chimica Acta*, Vol. 94: pp. 161-167

**Larson, R.B. & S.L. Schaeffer (1982):** A rapid method for determining the toxicity of chemicals to activated sludge. *Water Research*, Vol. 16: pp. 675-680

**Larsson, L., S. Saellstoem-Baum & M.-F. de la Cochetiere-Collinet. (1984):** A two step extraction procedure for concentrating acidic organic volatiles in aqueous solution prior to gas chromatographic head-space analysis, as exemplified by short chain fatty acids produced ... *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 2: pp. 9-14

**Lasserre, P. & T. Tournie (1984):** Use of microcalorimetry for the characterization of marine metabolic activity at the water-sediment interface. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, Vol. 74: pp. 123-139

**Liu, D. (1981):** A Rapid biochemical test for measuring chemical toxicity. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, Vol. 26: pp. 145-149

**Liu, D. & K. Thomson (1983):** Toxicity assessment of chlorobenzenes using bacteria. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, Vol. 31: pp. 105-111

**Liu, D., K. Thomson & K.L.E. Kaiser (1982):** Quantitative structure toxicity relationship of halogenated phenols to bacteria. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, Vol. 29: pp. 130-136

**Louie, H.W. (1983):** Determination of total mercury in fish: An improved method. *Analyst*, Vol. 108: pp. 1313-1317

**Mackay, D. (1982):** Correlation of bioconcentration factors. *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 16: pp. 274-278

**Mackay, D., A. Bobra & W.Y. Shiu (1980):** Relationships between aqueous solubility and octanol water partitioning coefficients. *Chemosphere*, Vol. 9: pp. 701-711

**Malek, I. (1976):** Physiological state of continuously grown microbial cultures. In: A.C.R. Dean, D.C. Ellwood, C.G.T. Evans & J. Melling (Eds.): *Continuous culture 6: Applications and new fields*. Ellis Horwood LTD., Publisher, Chichester, pp. 31-39

**Marison, I.W. & U. von Stockar (1985):** A novel bench scale calorimeter for biological process development work. *Thermochimica Acta*, Vol. 85: pp. 493-496

**Marti, E., A. Geoffroy, J. Affolter & A. Kabay (1979):** Kalorische Untersuchungen des bakteriellen Wachstums. In: E. Marti, H.R. Oswald und H.G. Wiedemann (Eds.): *Angewandte chemische Thermodynamik und Thermoanalytik; Experientia Supplementum 37*(1979): pp. 184-199

**Marts, R.M. & J.B. Blaha (1983):** Mixed acid solubilization procedure for determination of total mercury in food samples. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists (J. Assoc. Off. Anal. Chem.)*, Vol. 66: pp. 1421-1423

**May, K. & M. Stoeppler (1984):** Pretreatment studies with biological and environmental materials. IV: Complete wet digestion in partly and completely closed quartz vessels for subsequent trace analysis and ultratrace Mercury determ. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, Vol. 317: pp. 248-251

**May, Robert M. (Ed.) (1980):** *Theoretische Oekologie*. Verlag Chemie, Weinheim, 1980: 284 pp.

**Mayfield, C.I., D.W. Innies & P. Sain (1980):** Continuous culture of mixed sediment bacteria in the presence of mercury. *Water, Air, and Soil Pollution*, Vol. 13: pp. 225-349

**McFeters, G. A. , P. J. Bond, S. B. Olson & Y. T. Tchan (1983):** A comparison of microbial bioassays for the detection of aquatic toxicants. *Water Research*, Vol. 17: pp. 1757-1762

**McLeese, D. W. , V. Zitko, D. B. Sergeant, L. Burridge & C. D. Metcalf (1981):** Lethality and accumulation of alkylphenols in aquatic fauna. *Chemosphere*, Vol. 10: pp. 723-730

**McMillen, J. D. & H. E. Esch (1984):** Microcomputers for laboratory data collection. *The American Biology Teacher*, Vol. 46: pp. 157-161

**Meyer, M. (1984):** Oekologische Datensätze - Programme für AOS-Rechner und Basic Taschencomputer (TI-58/59, PC-1211/1212), Verlag Friedr. Vieweg und Sohn, Braunschweig/Wiesbaden

**Mitchell, P. (1966):** Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biological Reviews*, Vol. 41: pp. 445-502

**Molin, G. (1983):** Measurement of the maximum specific growth rate in chemostat of *Pseudomonas* spp. with different abilities for biofilm formation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 18: pp. 303-307

**Monod, J. (1942):** Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Herman et Cie, Paris.

**Monod, J. (1949):** The growth of bacterial cultures. *Annual Reviews of Microbiology*, Vol. 3: pp. 371-394

**Monod, J. (1950):** La Technique de Culture Continue Theorie et Applications. *Anales de L'Institut Pasteur*, Vol. 79: pp. 390-410

**Moos, L. P. , E. J. Kirsch, R. F. Wukasz & C. P. L. Grady Jr. (1983):** Pentachlorophenol Biodegradation 1: aerobic. *Water Research*, Vol. 17(11): pp. 1575-1584

**Morowitz, H. J. (1978):** Foundations of bioenergetics. Academic Press, New York, San Francisco, London

**Müller, G. -O. (1970):** Lehrbuch der angewandten Chemie. Bd. II. Chemisch mathematische Uebungen. S. Hirzel Verlag, Leipzig

**Müller, G. W. & T. Kick (1983):** BASIC-Programme für die angewandte Statistik: 32 Programme für Kleincomputer. Oldenbourg, München, Wien: ISBN 3-486-28011-2

**Müller, H. G.** (1982): Mikrocomputer bei der ökotoxikologischen Substanzprüfung. Vom Wasser, Vol. 59: pp. 67-72

**Munakata, K. & M. Kuwailara** (1969): Photochemical degradation products of pentachlorophenol. Residue Reviews, Vol. 25: pp. 13-23

**Narkis, N., S. Henefeld-Fourrier & M. Rebhun** (1980): Volatile organic acids in raw wastewater and in physico-chemical treatment. Water Research, Vol. 14: pp. 1215-1223

**Netheler, H.** (1977): Absorptionsphotometrie. In: H.U. Bergmeyer und K. Gawehn: Grundlagen der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 142-159

**Niimi, A. J. & C. Y. Cho** (1983): Laboratory and field analysis of Pentachlorophenol (PCP) accumulation by salmonids. Water Research, Vol. 17: pp. 1791-1795

**Nikaido, H. & M. Vaara** (1985): Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiological Reviews, Vol. 49: pp. 1-32

**Nonova, D. & K. Stoyanov** (1984): Extraction-spectrophotometric determination of traces of Copper (II), Zink (II), Cadmium (II) and Mercury (II) with 2-(5-Bromo-2-pyridylazo)-5-Diethylaminophenol. Microchimica Acta, Wien, Vol. 1: pp. 143-152

**OECD-Expert-Group** (1981): Summary of considerations in the report from the OECD-Expert-Group on Ecotoxicology; incl. Test Guideline 201, OECD; Guidelines for Testing of Chemicals; 2, rue Andre-Pascal, 75775 Paris Cedex 16, France.

**Odm, E. P.** (1983): Grundlagen der Oekologie. In zwei Banden. Bd. 1; zweite Auflage, G. Thieme Verlag, Stuttgart; New York

**Olson, Betty H.** (1984): Bakterien und Pilze - Biologische Umwandlung von Metallverbindungen. In: E. Merian (Ed.): Metalle in der Umwelt, Verlag Chemie, Weinheim, pp. 141-151

**Ou, L. -T.** (1984): 2,4-D degradation and 2,4-D degrading micro-organisms in soil. Soil Science, Vol. 137(2): pp. 100-107

**Pamatmat, M. M.** (1978): Oxygen uptake and heat production in a metabolic conformer (*Littorina irrorata*) and a metabolic regulator (*Uca pugnax*). Marine Biology, Vol. 48: pp. 317-325

**Pelczar Jr., M. J. & E. C. S. Chan (1981):** Elements of microbiology - international students edition. Mc Graw-Hill, Inc., ISBN 0-07-066472-2

**Pilz, U. & G. Axt (1984):** Weiterentwicklung eines kontinuierlich arbeitenden Bakterientoximeters. A continuously working apparatus for monitoring substances that are toxic to bacteria. Vom Wasser, Vol. 62(1984): pp. 91-100

**Pirt, S. J. (1966):** The maintenance energy of bacteria in growing cultures. Royal Society of London, Proceedings Series B, Vol. 163: pp. 224-231

**Pirt, S. J. (1975):** Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publisher; Oxford

**Pirt, S. J. (1982):** Maintenance energy: a general model for energy-limited and energy-sufficient growth. Archives of Microbiology, Vol. 133: pp. 300-302

**Pitter, P. (1976):** Determination of degradability of organic substances. Water Research, Vol. 10: pp. 231-235

**Poore, V. & A. E. Beezer (1983):** Systematic errors in the measurement of heat by flow microcalorimetry. Thermochimica Acta, Vol. 63: pp. 133-144

**Prochazka, G. J., W. J. Payne & W. R. Mayberry (1970):** Calorific content of certain bacteria and fungi. Journal of Bacteriology, Vol. 104(2): pp. 646-649

**Proper, G. & J. C. Garver (1966):** Mass culture of the protozoa Colpoda steinii. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 7: pp. 287-296

**Prosi, F. (1983):** Heavy metals in aquatic organisms. In: U. Förstner & G. T. W. Wittmann (Eds.): Metal pollution in the aquatic environment. Springer Verlag, Berlin, pp. 272-323

**Qiwi, C. G. J. Lawson & G. Deen (1985):** Study of models of single populations: Development of equations used in microorganism cultures. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 29: pp. 682-686

**Radek, E. & H.-P. Friedel (1981):** Das neue Chemikaliengesetz. Gesetz zum Schutz vor gefährlichen Stoffen. C. H. Beck, München

**Randzio, S. & J. Suurkuusk (1980):** Interpretation of calorimetric thermograms and their dynamic corrections. In: A.E. Beezer (Ed.): Biological Microcalorimetry. Academic Press, New York, 1980: pp. 311-341

**Rao, M.G., R.G. Surlock & Y.Y. Wu (1983):** Miniature silicone diode thermometers for cryogenics. Cryogenics, Dec. 1983: pp. 635-638

**Redl, B. & F. Tiefenbrunner (1981a):** Microcalorimetric investigations of the action of certain heavy metal ions on nongrowing *Escherichia coli* cells. Thermochimica Acta, Vol. 49: pp. 111-122

**Redl, B. & F. Tiefenbrunner (1981b):** Determination of hydrolytic activities in wastewater systems by microcalorimetry. Water Research, Vol. 15: pp. 87-91

**Reinhardt, H.-D. & D. Backhaus (1984):** Standardisierter Mikrowachstum als Testobjekt für ökochemische Faktoren im Wasser. In: B. Scheele, F. Fuhr & E. Stüttgen (Eds.): siehe unter Herausgebernamen. Pp. 115-132

**Reis, A., N. Kirmaier & F. Hartmann (1984):** Biokalorimeter zur Messung indikatorischer Werte für den Belastungsgrad von Wässern, In: B. Scheele, F. Fuhr und E. Stüttgen: Methoden zur ökotoxikologischen Bewertung von Chemikalien. Jul-Spez-276 der Kernforschungsanlage Jülich m.b.H. Siehe unter Herausgebernamen.

**Renberg, L. (1981):** Gas chromatographic determination of phenolic compounds in water, as their Pentafluorobenzoyl derivatives. Chemosphere, Vol. 10: pp. 767-773

**Rippka, R., J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herdman & R.Y. Stanier (1979):** Generic assignments, strain histories and Properties of pure cultures of cyanobacteria. Journal of General Microbiology, Vol. 111: pp. 1-61

**Rodriguez, J., C. Rey, V. Perez-Villar, J.B. Dubes, H. Tachoire & V. Torra (1984):** The identification of variable mass conduction calorimetry systems. Thermochimica Acta, Vol. 75: pp. 51-58

**Roederer, G. (1983):** Differential toxic effects of Mercuric-chloride and Methylmercuric-chloride on the freshwater alga *Potriochromonas malhamensis*. Aquatic Toxicology, Vol. 3: pp. 23-34

**Rogerson, A., W.Y. Shiu, G.L. Huang, D. Mackay & J. Berger (1983):** Determination and interpretation of hydrocarbon toxicity to ciliate protozoa. Aquatic Toxicology, Vol. 3: pp.215-228

**Rothbaum, H.P. & H.M. Stone (1961):** Heat output of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 81: pp. 172-177

**Saarikoski, J., R. Lindstroem, M. Tynnela & M. Viluksela (1986):** Factors affecting the absorption of phenolics and carboxylic acid in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 11: pp. 158-173

**Sansonl, B. & W. Kracke (1969):** Aufschluss durch Veraschung organischer Substanzen durch Radikale in wässriger Lösung. *Z. Anal. Chem.*, Vol. 243: pp. 209-241

**Savageau, M.A. (1983):** *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanism of gene control. *The American Naturalist*, Vol. 122: pp. 732-743

**Schaarschmidt, B., I. Lamprecht & M. Simonis (1979):** Kalorimetrische Messungen zum Einfluss von Nystatin auf den Energiestoffwechsel von Hefen. In: E. Marti, H.R. Oswald & H.G. Wiedemann (Eds.): *Angewandte chemische Thermodynamik und Thermoanalytik*. Birkhäuser Verlag, Basel: pp. 176-183

**Scheele, B., F. Fuhr & E. Stüttgen (Eds., 1984):** Methoden zur ökotoxikologischen Bewertung von Chemikalien. Band V: Aquatische Systeme; Teil II, Bericht 1978-1984. Spezielle Berichte der Kernforschungsanlage Jülich - Nr. 276; Zentralbibliothek der KFA-Jülich, Postfach 1913, D-5170 Jülich

**Schön, A. (1983):** 12-Bit A/D-Wandler - CMOS-Technik direkt am Prozessortbus. *MicroComputer (MC)*, 11/1983: pp. 100-102

**Schuller, D. & J. Kahle (1984):** Mikrokalorimetrisches Verfahren zur ökotoxikologischen Beurteilung von Chemikalien: Teil II: Arbeiten zur Standardisierung und Charakterisierung von kontinuierlich gehaltenen Mischkulturen. In: Scheele, B., F. Fuhr und E. Stüttgen: *Methoden zur Ökotoxikologischen Bewertung von Chemikalien*. KFA-Jülich; JÜL-SPEZ 276 Okt. 1984 (siehe unter Schelle, Fuhr und Stüttgen, 1984).

**Schuller, D. & P. Weppen (1983):** Application de la Biocalorimétrie a la détermination de l'Ecotoxicité de Substances chimiques sur les Systèmes écologiques des Eaux. In: *Association Française de Calorimétrie et d'Analyse Thermique (AFCAT) (Ed.): Journées de La Gaillarde, 16-17 Mai 1983: Vol. XIV; pp. 264-266*

**Schuller, D. & P. Weppen (1984):** Mikrokalorimetrisches Verfahren zur ökotoxikologischen Beurteilung von Umweltchemikalien; Teil 1: Mikrokalorimetrische Untersuchungen an kontinuierlich gehaltenen bakteriellen Reinkulturen. In: B. Scheele, F. Führ & E. Stüttgen (Eds.): Methoden zur ökotoxikologischen Bewertung von Chemikalien. Band 5: Aquatische Systeme II. Berichte 1978-1984. Jul-Spez. 276, ISSN 0343-7639: pp. 82-98

**Seto, M. & T. Tazaki (1971):** Carbon dynamics in the food chain system of glucose, *E. coli*, *Tetrahymena vorax*. Japanese Journal of Ecology, Vol. 21: pp. 179-188

**Sittig, M. (Ed.), (1980):** Priority Toxic Pollutants; health impacts and allowable limits. Noyes Data Corporation, Park Ridge, New Jersey, U.S.A.; 370 pp.

**Slabbert, J.L. & W.S.G. Morgan (1982):** A bioassay technique using *Tetrahymena pyriformis* for the rapid assessment of toxicants in water. Water Research, Vol. 16: pp. 517-523

**Sleat, R. & R.A. Mah (1984):** Quantitative method for colorimetric determination of formate in fermentation media. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 47(4): pp. 884-885

**Smeets, J. (1978):** Ecotoxicological aspects of the european environmental action programmes. Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 2: pp. 143-150

**Smies, M. (1983):** On the relevance of microecosystems for risk assessment: Some considerations for environmental toxicology. Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 7: pp. 355-365

**Stock, J.B., B. Rauch & S. Roseman (1977):** Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 252: pp. 7850-7861

**Suzuki, T. (1977):** Metabolism of Pentachlorophenol by a soil microbe. J. Environ. Sci. Hlth., Vol. 12B: pp. 123-127

**Tempest, D.W. (1970):** The continuous cultivation of microorganisms. I. Theory of the chemostat. In: J.R. Norris & I.W. Ribbons: Methods in Microbiology, Volume 2; Academic Press, London & New York, pp. 259-276

**Tevlin, M.P. (1978):** An improved experimental medium for freshwater toxicity studies using *Daphnia magna*. Water Research, Vol. 12: pp. 1017-1024

**Tournie, T. & P. Lasserre (1984):** Microcalorimetric characterization of seasonal metabolic trends in marine microcosms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, Vol. 74: pp. 111-121

**Tsuchiya, H.M., J.F. Drake, J.L. Jost & A.G. Fredrickson (1972):** Predator-prey interactions of *Dictyostelium discoideum* and *Escherichia coli* in continuous culture. *Journal of Bacteriology*, Vol. 110(3): pp. 1147-1153.

**Vaara, M. & H. Nikaido (1984):** Molecular organisation of bacterial outer membrane. In: E.Th. Rietschel (Ed.): *Handbook of Endotoxin*. Vol. 1: Chemistry of Endotoxin. Elsevier, Amsterdam: pp. 1-45

**Van Dam, K. & M.M. Mulder (1984):** Thermodynamic description of bacterial growth, IUB-IUPAB Bioenergetics Groups; Third european bioenergetics conference, Hannover, Germany, Sep. 2-7/1984; short reports Vol. 3b: pp. 509-510

**Vaughan, G.M. & G.A. Holder (1984):** Substrate removal in the trickling filter process. *Journal Water Pollution Control Federation*, Vol. 56(5): pp. 417-422

**Wadso, I. (1970):** Microcalorimeters. Quarterly reviews of biophysics, Vol. 3: pp. 383-427

**Wadso, I. (1980):** Calorimetric instrumentation for studies of biopolymer model compounds. *Pure and applied Chemistry*, Vol. 52: pp. 465-477

**Wadso, I. (1985):** Isothermal biocalorimetry. A status report. *Thermochimica Acta*, Vol. 88: pp. 35-48

**Weinbach, E.C. (1956):** The influence of Pentachlorophenol on oxidative and glycolytic phosphorylation in snail tissue. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 64: pp. 129-143

**Weinbach, E.C. (1957):** Biochemical basis for the toxicity of Pentachlorophenol. *National Academy of Sciences. Proceedings*, Vol. 43: pp. 393-397

**Weinbach, E.C. & J. Garbus (1965):** The interaction of uncoupling phenols with mitochondria and with mitochondrial protein. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 240(4): pp. 1811-1819

**Weppen, P. (1983):** Differentialkalorimetrische Untersuchungen des Einflusses von Schadstoffen auf den Energieumsatz ausgewählter Mikroorganismen. Diplom-Arbeit im Fachbereich Biologie der Universität Oldenburg (unveröffentlicht); 195 pp.

**Weppen, P. (1985):** Calorimetric studies on the usability of energy-balances of microbial populations for an ecotoxicological testing strategy. *Thermochimica Acta*, Vol. 94: pp. 139-149

**Weppen, P. & D. Schuller (1984a):** Microcalorimetric studies of the mode of action of environmental chemicals on continuous microbial cultures. *Thermochimica Acta*, Vol. 72: pp. 95-102

**Weppen, P. & D. Schuller (1984b):** On the variation of the heat dissipation by chemoorganotrophic bacteria under the influence of Pentachlorophenol (PCP), Phenol, 2-Nitrophenol and mercuric-chloride. IUB-IUPAB Bioenergetics Groups: Third european bioenergetics conference, Hannover, Germany, sep. 2-7/1984: Short Reports, Vol. 3b: pp. 603-604

**Weppen, P. & D. Schuller (1984c):** Interrelations between the physiological state of a microbial culture and toxic effects of selected chemicals. Third european symposium on Thermal analysis and calorimetry, Sep. 9-15/1984, Interlaken, Switzerland, Abstracts of papers: p. G-171-PO

**Wiebe, W.J. & K. Bankroft (1975):** Use of adenylate energy charge ratio to measure growth state of natural microbial communities. *Roc. Nat. Acad. Sci. USA*, Vol. 72(6): pp. 2112-2115

**Williamson, K.J. & D.G. Johnson (1981):** A bacterial bioassay for assessment of wastewater toxicity. *Water Research*, Vol. 15: pp. 383-390

**Wong, A. & D.G. Crosby (1981):** Photodecomposition of Pentachlorophenol in water. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 29: pp. 125-130

**Yamazaki, S., Y. Dokiya, T. Watanabe & K. Fuwa (1978):** Problems in mercury determination in environmental samples. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 2: pp. 1-8

**Zauke, G.-P. & T. Hopner (1982):** Beziehungen zwischen den Summenparametern CSB und TOC in einer Fließgewasser-Versuchsstrecke. *Vom Wasser*, Vol. 58: pp. 257-267

**Zilberstein, D., V. Agmon, S. Schuldiner & E. Padan (1984):** *Escherichia coli* intracellular pH, membrane potential and cell growth. *Journal of Bacteriology*, Vol. 158: pp. 246-252

## Lebenslauf

- 07.11.56 Geboren in Osnabrück Stadt als Sohn der Eheleute Anneliese Weppen, geb. Heringlake und Friedrich Weppen
- 1964-67 Besuch der Grundschule in Osnabrück
- 1967-76 Besuch des Ratsgymnasiums zu Osnabrück
- 1976 Abitur im naturwissenschaftlichen Zweig des Ratsgymnasiums zu Osnabrück
- 1976 Zum Wintersemester 1976/77 Beginn des Studiums an der Universität Oldenburg im Studiengang Diplom-Biologie
- 1978-79 Tutorentätigkeit in den Fächern Zoophysiologie, Entomologie und Histochemie
- 1979 Absolvierung des Vordiploms im Fach Biologie der Universität Oldenburg
- 1979-83 Wissenschaftliche Hilfskraft bei Prof. Dr. D. Schuller in einem Drittmittelforschungsvorhaben
- 1983 Absolvierung des Diploms im Fach Biologie an der Universität Oldenburg bei den Hochschullehrern Prof. Dr. D. Schuller und Prof. Dr. T. Höpner
- 1983-84 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Drittmittelforschung im Fachbereich Chemie der Universität Oldenburg.
- 1984-86 Wissenschaftlicher Angestellter des Fachbereiches Chemie der Universität Oldenburg mit Aufgaben in der physikalischen Chemie.
- 1984-85 Teilnahme an einem Fernstudienkurs ökologie der Universität Tübingen
- 1983-86 Promotionsstudium im Fachbereich Chemie der Universität Oldenburg zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
- seit 1986 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der GBF-Braunschweig



### **Erklärung**

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt habe und keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Oldenburg, den 28.08.86

(Peter Weppen)













